

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

Л.Страйер

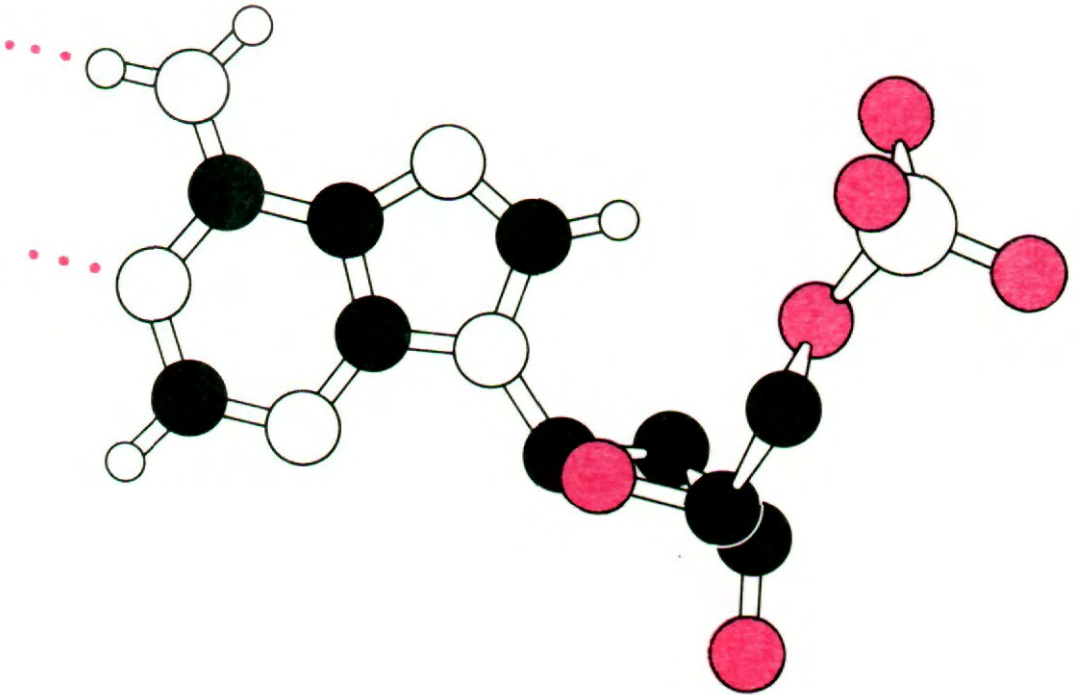
БИОХИМИЯ

Second Edition

BIOCHEMISTRY

Lubert Stryer
Stanford University

W.H. Freeman and Company
San Francisco



Л.Страйер

В 3-х томах

БИО ХИМИЯ

Перевод с английского канд. биол. наук М.Д.Гроздовой
и канд. биол. наук А.М.Колчинского

Под редакцией академика С.Е.Северина

ТОМ **3**

Москва «Мир»
1985

ББК 28.072
С 83
УДК 577.1

Страйер Л.

С 83 Биохимия: В 3-х т. Т.3 Пер. с англ.- М.: Мир, 1985,-
400 с., ил.

В книге ученого из США на самом современном научном уровне рассмотрены основные проблемы биохимии и молекулярной биологии.

Третий том посвящен хранению, передаче и реализации генетической информации, а также молекулярным основам ряда физиологических процессов (иммунной защите, действию гормонов, транспорту веществ в клетке, работе биологических мембран).

Предназначена для биохимиков, молекулярных биологов, физиологов, химиков, медиков, для студентов, аспирантов и преподавателей биологических, химических и медицинских специальностей.

С $\frac{2001040000-372}{041(01)-85}$ св. пл. подп. изд., 1985

ББК 28.072
57.04

Редакция литературы по биологии

© 1975, 1981 by Lubert Stryer

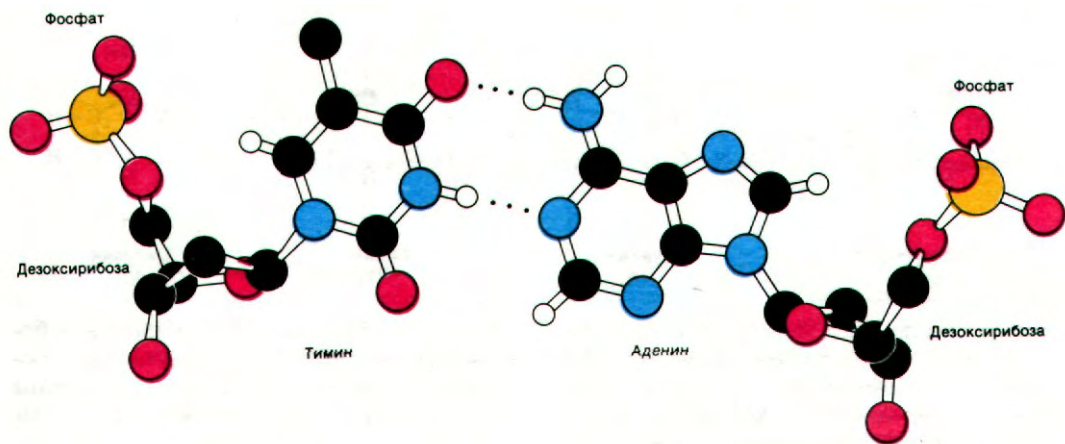
© перевод на русский язык, «Мир»,
1985

Часть



Информация

Хранение, передача и экспрессия
генетической информации

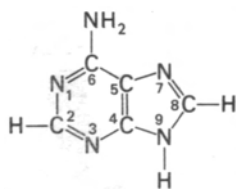


Модель пары дезоксирибонуклеотидных мономеров двойной спирали ДНК. В этой паре аденин связан водородной связью с тиминном.

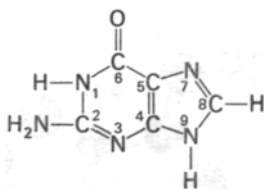
ГЛАВА 24

ДНК: генетическая роль, структура и репликация

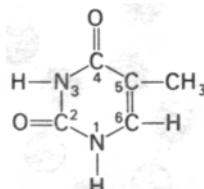
Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) - молекула наследственности. ДНК - очень



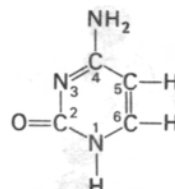
Аденин
(А)



Гуанин
(G)



Тимин
(Т)



Цитозин
(С)

длинная нитевидная молекула, состоящая из большого числа рибонуклеотидов. *Пуриновые и пиримидиновые основания ДНК несут генетическую информацию, тогда как сахарные и фосфатные группы выполняют структурную роль.* В настоящей главе обсуждаются структура, генетическая роль и репликация ДНК, причем основное внимание уделяется ДНК прокариот, так как эти организмы устроены проще и подчиняются общим для всех организмов законам. Хромосомы эукариотических клеток рассматриваются в гл. 29.

24.1. Ковалентная структура и номенклатура ДНК

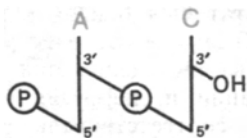
Остов ДНК имеет одинаковое строение на всем протяжении молекулы. Он состоит из остатков дезоксирибозы, связанных фосфодиэфирными мостиками. 3'-гидроксильная группа остатка сахара одного дезоксирибонуклеотида соединена с 5'-гидроксильной

группой соседнего сахара фосфодиэфирной связью. *Вариабельной* в ДНК является последовательность оснований. ДНК содержит четыре типа оснований: два пуриновых основания - *аденин* (А) и *гуанин* (G); два пиримидиновых основания - *тимин* (Т) и *цитозин* (С). Строение цепи ДНК показано на рис. 24.2.

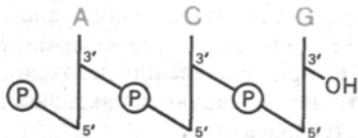
Строение ДНК можно изобразить и более кратким путем. В этом случае для обозначения четырех основных нуклеотидов используются следующие символы:



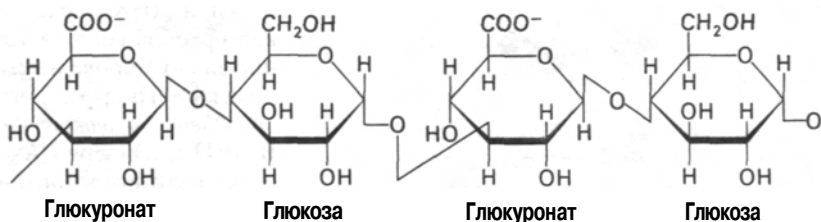
Вертикальные линии в приведенных символах соответствуют остаткам сахара, буквы А, G, С и Т - основаниям. Диагональная линия с символом **P** (на схеме, приведенной ниже), обозначает фосфодиэфирную связь. Эта диагональная линия соединяет конец одной вертикальной линии с серединой другой. Точки соединения соответственно означают 5'-ОН- и 3'-ОН-группы. В приведенном ниже примере символ **P** указывает, что дезоксиаденилат связан с дезоксицитидином фосфодиэфирным мостиком. 3'-ОН-группа дезоксиаденилата присоединена к 5'-ОН-группе дезоксицитидина через фосфорильную группу:



Предположим теперь, что с дезоксицитидином этого динуклеотида связан дезоксигуанилат. Соответствующий тринуклеотид можно представить следующим образом:



Сокращенное обозначение этого тринуклеотида - pApCpG или ACG.



Цепь ДНК характеризуется полярностью. Один конец цепи несет 5'-ОН-группу, а другой - 3'-ОН-группу, которая не связана с другим нуклеотидом. Согласно принятым сокращениям, символ ACG означает, что свободная 5'-ОН-группа принадлежит дезоксиаденозину, а свободная 3'-ОН-группа - дезоксигуанозину. Итак, *последовательность оснований пишется в направлении 5'—>3'.* Напомним, что аминокислотная последовательность белка пишется в направлении от N-концевой аминокислоты к С-концевой аминокислоте. Следует отметить, что ACG и GCA - разные соединения, точно так же, как Glu-Phe-Ala отличается от Ala-Phe-Glu.

24.2. Трансформация пневмококков с помощью ДНК показала, что гены состоят из ДНК

Бактерии пневмококки сыграли важную роль в открытии генетической функции ДНК.

Пневмококки обычно окружены слизистой блестящей полисахаридной капсулой. Этот наружный слой имеет существенное значение для проявления патогенности

бактерий. Они вызывают пневмонию у человека и других чувствительных млекопитающих. Мутанты, лишенные полисахаридной оболочки, не патогенны. Бактерии дикого типа обозначают буквой S (от англ. smooth - гладкий), так как они образуют гладкие колонии, а мутантные бактерии, не имеющие капсулы, - буквой R (от англ. rough - шероховатый), так как они образуют шероховатые колонии. У одной группы R-мутантов отсутствует фермент дегидрогеназа, превращающий UDP-глюкозу в UDP-глюкуронат. Фермент необходим для синтеза капсульного полисахарида, который у этих пневмококков состоит из чередующейся последовательности остатков глюкозы и глюкуроната:

В 1928 г. Фред Гриффит (Fred Griffith) обнаружил, что непатогенный R-мутант можно *трансформировать* в патогенную S-форму следующим путем. Он инъецировал мышам смесь живых бактерий R-формы и убитых нагреванием пневмококков S. Поразительное открытие Гриффита состояло в том, что эта смесь вызывала гибель мышей, хотя ни живые R-пневмококки, ни убитые нагреванием S-пневмококки мышей не убивали. Кровь погибших мышей содержала живые S-пневмококки. Следовательно, убитые нагреванием S-пневмококки каким-то образом трансформировали живые R-пневмококки в живые S-пневмококки. Это изменение было стабильным: трансформированные пневмококки давали патогенное потомство S-формы. Затем было установлено, что такая трансформация R—>S может происходить *in vitro*. Некоторые клетки в растущей культуре R-формы трансформировались в S-форму при добавлении *бесклеточного экстракта* убитых нагреванием пневмококков S. Это открытие заложило основу для

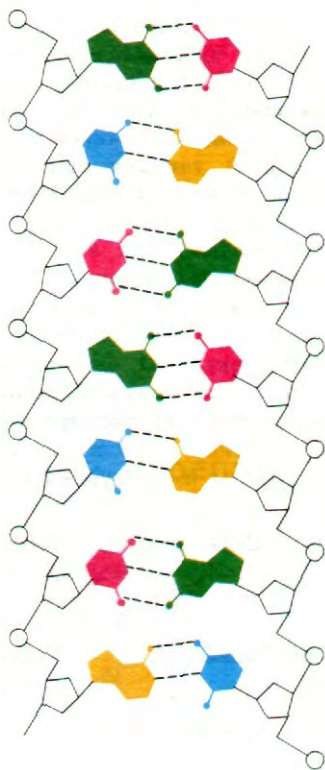


Рис. 24.1. Схема структуры ДНК. Сахарофосфатный остов показан черным цветом, а пуриновые и пиримидиновые основания разноцветные. (Kornberg A., The synthesis of DNA; Scientific American, Inc., 1968.)

изучения химической природы трансформирующего начала.

Исследователи стали фракционировать бесклеточный экстракт убитых нагреванием пневмококков S и определять трансформирующую активность его компонентов (рис. 24.3). В 1944 г. Освальд Эйвери, Колин Мак-Леод и Маклин Мак-Карти (Oswald Avery, Colin MacLeod, Maclyn McCarty) опубликовали результаты своей работы. Оказалось, что «нуклеиновая кислота дезоксирибозного типа - основное действующее начало трансформирующего экстракта пневмококка типа III.» Экспериментальные доказательства этого заключения состояли в следующем: 1) при элементарном химическом анализе очищенного, высокоактивного трансформирующего на-

чала результат был близок к расчетному для ДНК; 2) оптические, электрофоретические свойства, поведение при ультрацентрифугировании и диффузия очищенного материала соответствовали свойствам ДНК; 3) при экстрагировании белков или липидов не происходило потери трансформирующей активности; 4) трипсин и химотрипсин не влияли на трансформирующую активность; 5) рибонуклеаза (которая, как известно, гидролизует рибонуклеиновую кислоту) не влияла на трансформирующее начало; 6) при добавлении дезоксирибонуклеазы трансформирующая активность, наоборот, терялась.

Эта работа - памятная веха в истории биохимии. До 1944 г. считалось, что генетическую информацию несут хромосомные белки, а ДНК играет вторичную роль. Такая преобладающая точка зрения была решительно опровергнута открытием строго доказанного факта, что *очищенная ДНК обладает генетической специфичностью*. В 1943 г. Эйвери (Avery) живым языком описал это исследование и его последствия

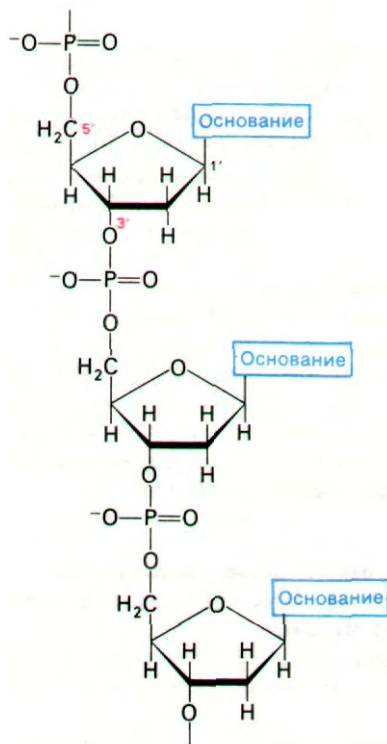


Рис. 24.2. Строение одной цепи ДНК. Показана часть цепи.

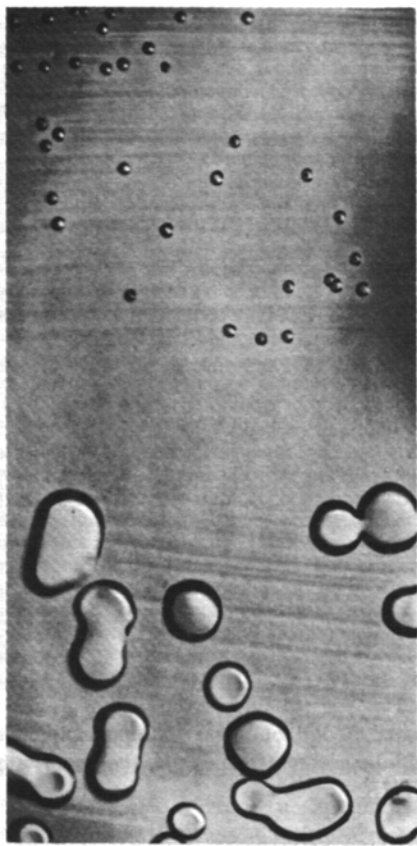


Рис. 24.3. Трансформация непатогенного пневмококка R (мелкие колонии) и возникновение патогенного пневмококка S (крупные блестящие колонии) под действием ДНК из убитых нагреванием пневмококков S. [Avery O. T., MacLeod C. M., McCarty M., J. Exp. Med., 79, 158 (1944).]

в письме, направленном брату в другой университет (рис. 24.4).

Новое подтверждение генетической роли ДНК было получено при изучении одного вируса (бактериофага), заражающего *E. coli*. Бактериофаг T2 состоит из сердцевины (ДНК), заключенной в белковую оболочку. В 1951 г. Роджер Херриот (Roger Herriott) предположил, что «вирус, очевидно, действует, как крошечный шприц для подкожных инъекций, наполненный трансформирующим началом; вирус как таковой никогда не проникает в клетку; только отросток вступает в контакт с клеткой-хо-

зяином и, возможно, ферментативно прорезывает небольшое отверстие в наружной мембране (рис. 24.5). Затем нуклеиновая кислота из головки вируса перетекает внутрь клетки». Чтобы проверить это предположение Альфред Херши и Марта Чейз (Alfred Hershey, Martha Chase) поставили следующий опыт. Фаговую ДНК поместили радиоактивным изотопом ^{32}P , а белковую оболочку - изотопом ^{35}S . Эти метки весьма специфичны, так как ДНК не содержит серы, а в белковой оболочке нет фосфора. Культуру *E. coli* заразили помеченным фагом, который за непродолжительное время инкубации прикреплялся к бактерии. Суспензию обрабатывали в течение нескольких минут в гомогенизаторе Уоринга при 10000 об/мин. В этих условиях зараженные фагом клетки подвергались воздействию значительных сил сдвига, которые разрушали связи между вирусами и бактериями. Затем суспензию центрифугировали, чтобы осадить бактерии на дно пробирки. Полученный осадок содержал зараженные бактерии, а надосадочная фракция - более мелкие частицы. Исследуя содержание ^{32}P и ^{35}S в осадке и надосадочной фракции, определяли локализацию фаговой ДНК и белка оболочки. В результате были получены следующие данные.

1. Большая часть фаговой ДНК обнаруживалась в бактериях.

2. Большая часть фагового белка обнаруживалась в надосадочной фракции.

3. Обработка в гомогенизаторе почти не влияет на способность зараженных бактерий продуцировать вирусное потомство.

Дополнительные эксперименты показали, что менее 1% ^{35}S было перенесено из родительских фаговых частиц фаговому потомству; 30% родительской ^{32}P -метки, наоборот, обнаруживалось в потомстве. Эти простые, убедительные эксперименты показали, что *фаг T2 можно физически разделить на генетическую и негенетическую части...* Серусодержащий белок покоящихся фаговых частиц содержится только в защитной оболочке, которая обеспечивает прикрепление фаговой частицы к бактериальной клетке и функционирует в качестве приспособления для введения фаговой ДНК в клетку. Этот белок, возможно, не несет никакой функции, необ-

24. ДНК: генетическая роль, структура и репликация

В течение последних двух лет, вначале с Мак-Леодом, а в настоящее время с д-ром Мак-Карти, я пытаюсь выяснить, какова химическая природа того вещества в бактериальных экстрактах, которое вызывает это специфическое изменение. В неочищенном экстракте бактерий типа III полно капсульных полисахаридов, углеводов С (соматического), нуклеопротеинов, свободных нуклеиновых кислот дрожжевого и тимусного типа, липидов и других клеточных компонентов. Попробуй найти в таких сложных смесях активное начало! Попробуй выделить и химически идентифицировать именно то вещество, которое само, придя в соприкосновение с R-клетками типа II, заставляет их вырабатывать капсульный полисахарид типа III и приобрести все аристократические особенности того самого типа клеток, из которых был приготовлен экстракт! Вот это работа, полная проблем и неожиданных затруднений. Но, ВОЗМОЖНО, мы наконец достигли своего.

...Если окажется, что мы правы - а это, разумеется, очень веское «если», - тогда можно считать, что нам известна и химическая природа индуцирующего начала, и химическая структура вещества, которое в результате образуется. Первое - это тимусная нуклеиновая кислота, второе - полисахарид типа III. Оба они впоследствии воспроизводятся в дочерних клетках, и через бесчисленное множество переносов без повторного добавления индуцирующего агента можно выделить то же самое активное и специфичное трансформирующее начало в количестве, значительно превышающем то, которое было использовано в самом начале для индуцирования реакции. Это напоминает вирус. Возможно, это - ген. Но механизм явления меня сейчас не интересует. Всему свое время, и первым шагом должно быть выяснение химической природы трансформирующего начала. Остальные вопросы пусть решает кто-нибудь еще. Конечно, с каждым шагом работа обрывает трудностями. Она затрагивает биохимию нуклеиновых кислот тимусного типа, которые, как известно, составляют основную часть хромосом, но которые до сих пор считали сходными независимо от их происхождения. Она затрагивает генетику, энзимологию, клеточный метаболизм и синтез углеводов. Но сегодня, только располагая множеством надежно обоснованных данных, можно убедить кого бы то ни было в том, что натриевая соль дезоксирибозной нуклеиновой кислоты, свободная от белка, могла бы обладать специфической биологической активностью. Именно такие данные мы и пытаемся теперь получить. Тут хватает всяких веселых неожиданностей, чтобы пойти на дно, но разумнее справиться с ними самому, прежде чем кто-нибудь другой попытается это сделать.

Рис. 24.4. Из письма Освальда Эйвери брату Рою, написанного в мае 1943 г. (Из статьи Hotchkiss R. D. In: Phage and the Origin of Molecular Biology, J. Cairns, S. Stent, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, 1966, pp. 185-186.)

клетках с диплоидным набором хромосом. Гаплоидные клетки имеют вполонину меньше ДНК.

24.3. Гены некоторых вирусов состоят из РНК

Гены всех прокариотических и эукариотических организмов построены из ДНК, гены вирусов - из ДНК или из РНК. Вирус табачной мозаики, заражающий листья

ходимой для роста фаговых частиц внутри клетки. ДНК же выполняет какую-то функцию в размножении фага. Представленные эксперименты не позволяют сделать более далеко идущие выводы относительно химической природы наблюдаемых явлений».

Осторожный тон этого вывода не должен умалать его значения. Вскоре генетическая роль ДНК стала общепризнанной. Эксперименты Херши и Чейз убедительно подтвердили факты, открытые восемью годами раньше Эйвери, Мак-Леодом и Мак-Карти на другой системе. Дополнительные доказательства были получены при исследовании содержания ДНК в отдельных клетках. Они показали, что для данного вида *содержание ДНК одинаково во всех*

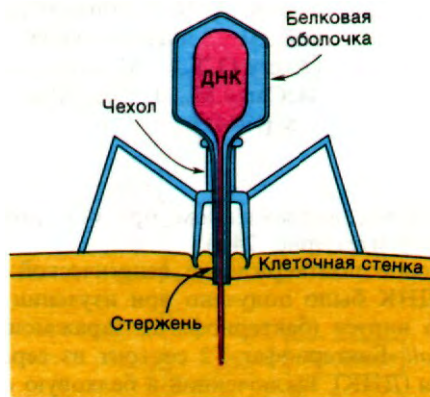


Рис. 24.5. Схема бактериофага T2, вводящего свою ДНК в бактериальную клетку. (Wood W.B., Edgar R.S., Building a Bacterial Virus, Scientific American, Inc., 1967.)

растений табака, - один из наиболее изученных РНК-содержащих вирусов. Он образован одной молекулой РНК, окруженной белковой оболочкой из 2130 одинаковых субъединиц (обсуждение структуры и сборки вирусов см. в гл. 30). Обработав вирус фенолом, можно отделить белок от РНК. *Изолированная вирусная РНК инфекционна, тогда как изолированный белок лишен инфекционности.* Использование синтетических гибридных вирусных частиц еще раз показало, что генетическая специфичность вируса заключается только в его РНК. Существует множество штаммов вируса табачной мозаики. Был получен синтетический гибридный вирус из РНК штамма 1 и белка штамма 2. Другой такой вирус был приготовлен из РНК штамма 2 и белка штамма 1. После заражения клетки гибридным вирусом *вирусное потомство всегда состояло из РНК и белка, соответствующих специфичности РНК гибридного вируса, использованного для заражения.*

24.4. Двойная спираль ДНК Уотсона-Крика

В 1953 г. Джеймс Уотсон и Френсис Крик (James Watson, Francis Crick) установили трехмерную структуру ДНК и сразу же предложили возможный механизм ее репликации. Это блестящее достижение стоит в ряду важнейших событий в истории биологии, так как оно открыло путь к пониманию функции гена на молекулярном уровне. Уотсон и Крик проанализировали картины дифракции рентгеновских лучей на нити ДНК (рис. 24.6), полученные Розалиндой Франклин и Морисом Уилкинсом (Rosalind Franklin, Maurice Wilkins), и предложили структурную модель, которая в основных своих чертах оказалась верной. Характерные особенности этой модели сводятся к следующему.

1. Две спиральные полинуклеотидные цепи закручены вокруг общей оси. Цепи направлены в противоположные стороны (рис. 24.7).

2. Пуриновые и пиримидиновые основания расположены внутри спирали, а остатки фосфата и дезоксирибозы - снаружи (рис. 24.8). Плоскости оснований перпендикулярны оси спирали. Плоскости остатков сахара расположены почти под прямым углом к основаниям.

3. Диаметр спирали 20 А. Расстояние

Межплоскостное расстояние 3,4 А

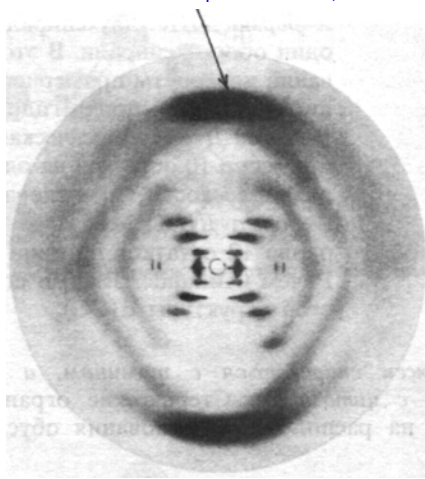


Рис. 24.6. Фотография дифракции рентгеновских лучей на влажной нити ДНК (В-форма). Крест в середине картины характерен для спиральной структуры. Интенсивные меридианальные рефлексы возникают в результате дифракции на стопке пар оснований, расположенных на расстоянии 3,4 А друг от друга. (Печатается с любезного разрешения д-ра Maurice Wilkins.)

между соседними основаниями вдоль оси спирали 3,4 А, они повернуты относительно друг друга на 36°. Таким образом, на один виток спирали каждой из цепей приходится 10 нуклеотидов, что соответствует 34 А.

4. Две цепи удерживаются вместе водородными связями между парами оснований. Аденин всегда спаривается с тиминном, гуанин - с цитозином (рис. 24.9 и 24.10).

5. На последовательность оснований в полинуклеотидной цепи не накладываются никаких ограничений. *Определенная последовательность оснований несет конкретную генетическую информацию.*

Важнейшее свойство двойной спирали - специфичность спаривания оснований. Исходя из стерических ограничений и способности к образованию водородных связей, Уотсон и Крик постулировали, что аденин

24. ДНК: генетическая роль, структура и репликация

Формы ДНК -

А-форма ДНК: двухспиральная ДНК, содержащая примерно 11 остатков на один оборот спирали. В этой правозакрученной спирали плоскости пар оснований повернуты примерно на 20° относительно перпендикуляра к оси спирали. Образуется при дегидратации В-формы ДНК.

В-форма ДНК: классическая уотсон-криковская двойная спираль, содержащая примерно 10 остатков на один оборот спирали. В этой правозакрученной спирали плоскости пар оснований перпендикулярны оси спирали.

Z-форма ДНК: левозакрученная двухспиральная форма ДНК, содержащая около 12 остатков на один оборот. Эта структура предложена Александром Ричем (Alexander Rich) и его сотрудниками на основе изучения кристаллической структуры $d(CG)_3$.

должен спариваться с тимином, а гуанин - с цитозином. Стерические ограничения на расположение основания обуслов-

лены периодическим строением спиральной структуры сахарофосфатного остова обеих полинуклеотидных цепей. Гликозидные связи, которыми присоединяется к остову пара оснований, отстоят друг от друга на расстояние 10,85 А (рис. 24.11). Пара пиримидин—пурин прекрасно укладывается в это пространство. В то же время для двух пуринов этого расстояния недостаточно. Для двух пиримидинов места более чем достаточно, но они оказались бы слишком далеко друг от друга, чтобы образовать водородные связи. Следова-

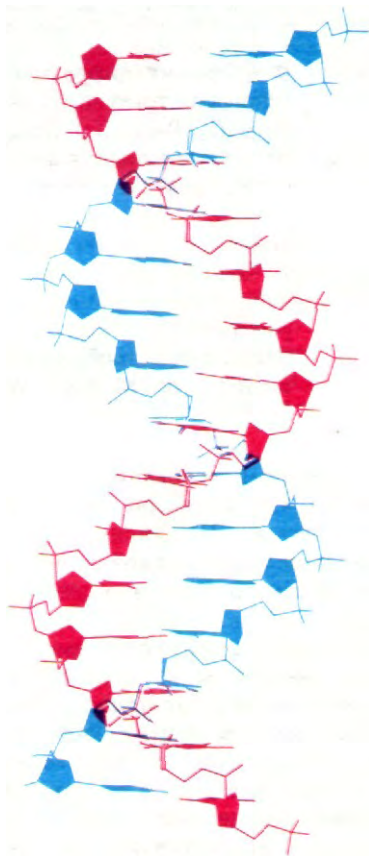


Рис. 24.7. Схема модели двухспиральной ДНК. Вся структура повторяется через 34 А, что соответствует 10 остаткам в каждой цепи.

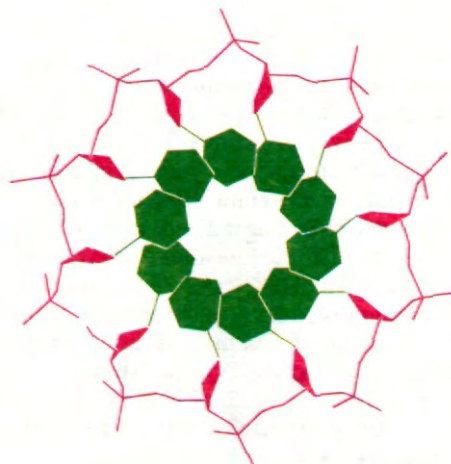


Рис. 24.8. Схема одной из цепей двойной спирали ДНК (вид по оси спирали). Основания - в данном случае только пиримидины - расположены внутри, а сахарофосфатный остов - снаружи. Отчетливо видно, что структура имеет ось симметрии десятого порядка. Основания обозначены зеленым цветом, сахара - красным.

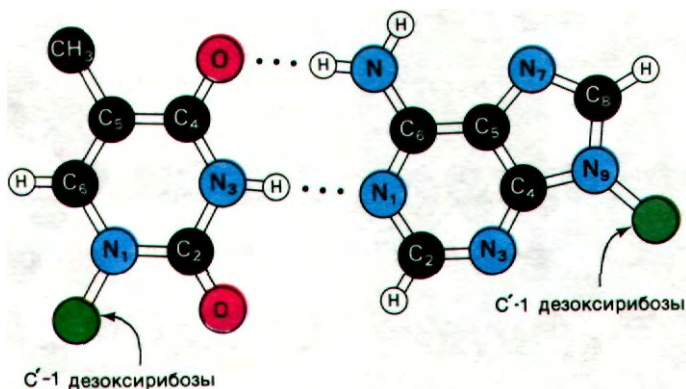


Рис. 24.9. Модель пары оснований аденин—тимин.

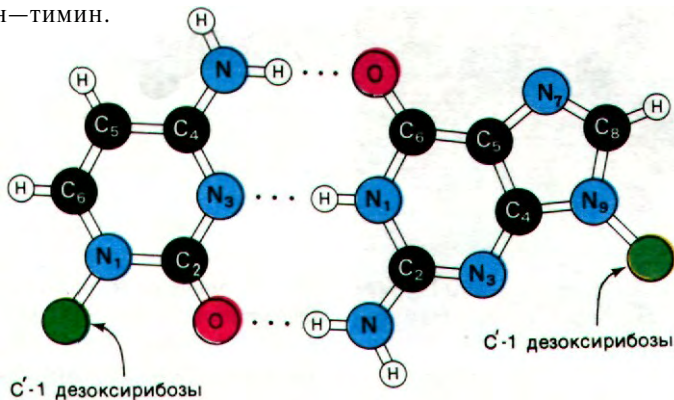


Рис. 24.10. Модель пары оснований гуанин—цитозин.

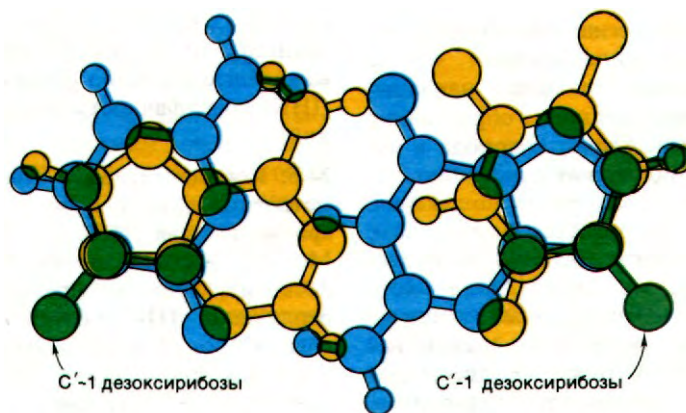


Рис. 24.11. Наложение АТ-пары оснований (обозначена желтым цветом) на ГС-пару (обозначена синим цветом). Обратите внимание, что положения гликозидных связей и С'-1 атома дезоксирибозы (обозначен зеленым) в двух типах пар оснований почти одинаковы.

24. ДНК: генетическая роль, структура и репликация

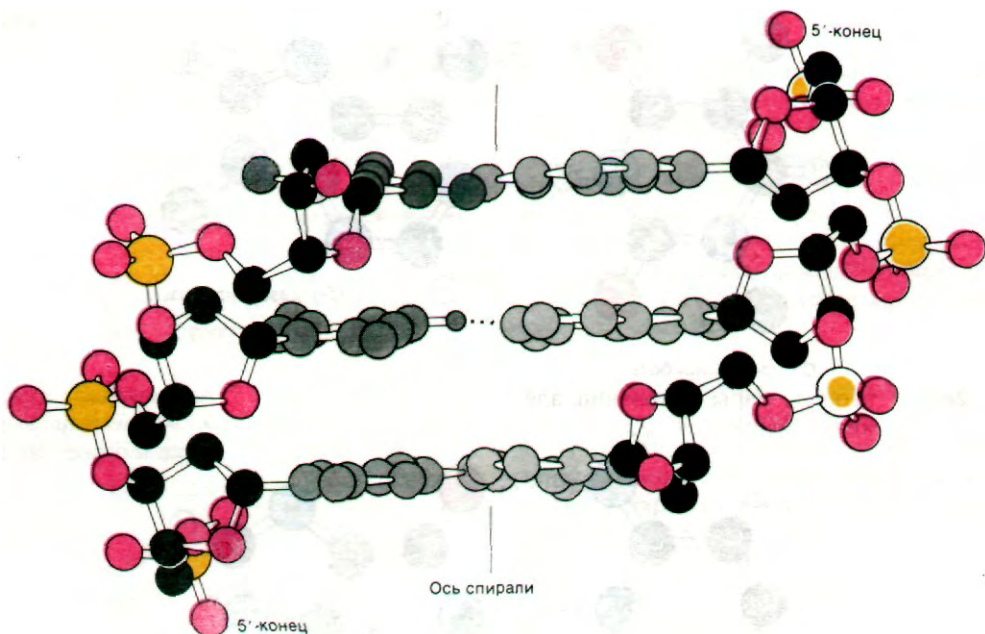


Рис. 24.12. Модель двухспиральной молекулы ДНК. Показаны три пары оснований. Обратите внимание, что две цепи ориентированы в противоположном направлении.

тельно, одно из оснований в паре в двойной спирали ДНК всегда должно быть пурином, а другое - пиримидином. Кроме того, на спаривание оснований накладывают ограничения правила образования водородных связей. Атомы водорода в пуриновых и пиримидиновых основаниях занимают вполне определенные положения. Аденин не может спариваться с цитозином, так как тогда на месте одной связи оказалось бы два атома водорода, а на месте другой - ни одного. Точно так же гуанин не может связываться с тиминном. Аденин, наоборот, образует с тиминном две водородные связи, а гуанин - три водородные связи с цитозином (рис. 24.9 и 24.10). Ориентация этих водородных связей и расстояние между ними оптимальны для сильного взаимодействия между основаниями.

Эта схема спаривания оснований получила убедительное подтверждение в резуль-

тате проведенных ранее исследований нуклеотидного состава ДНК разных видов. В 1950 г. Эрвин Чаргафф (Erwin Chargaff) обнаружил, что *соотношение аденина с тиминном и гуанина с цитозином у всех исследованных видов было близко к 1*. Значение этого факта оставалось неясным, пока не была предложена модель Уотсона-Крика (рис. 24.12 и 24.13). Только тогда стало понятным, что эта закономерность отражает важнейшее свойство структуры и функции ДНК - специфичность спаривания оснований.

24.5. Комплементарные цепи служат матрицами друг для друга при репликации ДНК

Модель двухспиральной молекулы ДНК позволила сразу же предложить механизм репликации ДНК. Уотсон и Крик опубликовали свою гипотезу через месяц после того, как представили модель структуры ДНК в виде прекрасной статьи, отличавшейся простотой и ясностью.

«Если задан определенный порядок оснований в одной из цепей, можно написать точную последовательность оснований в другой цепи, поскольку спаривание специфично. Таким образом, каждая из цепей комплементарна другой цепи, и именно это свойство подсказывает, каким образом может удваиваться молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты.

Прежние дискуссии о самоудвоении всегда опирались на представление о некой матрице или каком-то шаблоне. Предполагалось, что матрица копирует непосредственно самое себя, или должна образовывать «негатив», который в свою очередь действует в качестве матрицы и образует исходный «позитив». Ни в одном случае не было предложено детального объяснения, как это могло бы происходить на уровне атомов и молекул.

В нашей модели дезоксирибонуклеиновой кислоты имеется, по существу, *пара* матриц, причем каждая из них комплементарна другой. Мы полагаем, что перед удвоением водородные связи разрываются и две цепи раскручиваются и расходятся. Затем каждая цепь используется в качестве матрицы для образования на ней новой комплементарной цепи, так что в конце концов у нас будет *две* пары цепей, тогда как раньше была только одна. Более того, при таком способе репликация последовательность пар оснований будет в точности удвоена.



24.6. Репликация ДНК полуконсервативна
Уотсон и Крик предположили, что одна из цепей каждой дочерней молекулы ДНК синтезируется заново, а другая происходит от родительской молекулы ДНК. Такое распределение атомов родительской молекулы называют *полуконсервативным*. Метью Меселсон и Франклин Сталь (Matthew Meselson, Franklin Stahl) поставили принципиально важный эксперимент для проверки этой гипотезы. Родительскую ДНК поместили тяжелым изотопом азота ^{15}N , чтобы сделать ее более тяжелой, чем обычная ДНК. Для этого выращивали *E. coli* в течение многих поколений в среде, содержащей в качестве единственного источника азота $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. Затем бактерии быстро переносили в среду, содержащую ^{14}N -стабильный изотоп азота. Этот эксперимент должен был показать, как распределяются изотопы ^{14}N и ^{15}N в молекулах ДНК в ходе последующих циклов репликации.

Распределение ^{14}N и ^{15}N в потомстве изучали с помощью только что разработанного метода *равновесной седиментации в градиенте плотности*. Небольшое количество ДНК растворяют в концентрированном растворе хлористого цезия с плот-

Рис. 24.13. Пространственная модель двойной спирали ДНК. Отчетливо видны большая бороздка (показана красным цветом) и малая бороздка (показана синим цветом). Обратите внимание, что часть каждого основания доступна для взаимодействия с другими молекулами. (Печатается с любезного разрешения д-ра Sung-Hou Kim.)

ностью, близкой к плотности ДНК ($\sim 1,7 \text{ г/см}^3$). Этот раствор центрифугируют почти до равновесного состояния. Под действием противодействующих процессов седиментации и диффузии в центрифужной ячейке возникает градиент концентрации хлористого цезия. В результате создается устойчивый градиент плотности от $1,66$ до $1,76 \text{ г/см}^3$. Под действием центробежной силы молекулы ДНК переходят в ту область градиента, в которой плотность раствора равна их собственной плавающей плотности. Высокомолекулярная

24. ДНК: генетическая роль, структура и репликация

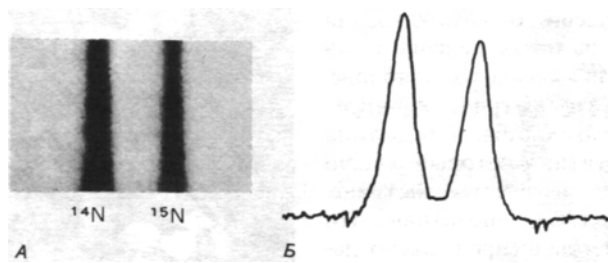


Рис. 24.14. Разделение ^{14}N - и ^{15}N -ДНК при центрифугировании в градиенте плотности. *А* - фотография центрифужной ячейки в ультрафиолетовом свете; *Б* - денситометрическая кривая поглощения, полученная при сканировании фотографии, приведенной на рис. *А*. [Meselson M., Stahl F. W., Proc. Nat. Acad. Sci., 44, 671 (1958).]

ДНК образует четко выраженную полосу, обнаруживаемую по поглощению ультрафиолетового света. Молекулы ^{14}N -ДНК и ^{15}N -ДНК хорошо разделяются в таком градиенте, поскольку их плотность различается примерно на 1% (рис. 24.14).

ДНК выделяли из бактерий через различные промежутки времени после переноса со среды, содержащей ^{15}N , на ^{14}N . Анализ этих образцов центрифугированием в градиенте плотности показал, что после одного цикла репликации ДНК дает одну полосу (рис. 24.15). Плотность этой полосы была равна в точности среднеарифметическому значению между плотностью ^{14}N - и ^{15}N -ДНК. *Отсутствие ^{15}N -ДНК свидетельствовало о том, что целостность родительской ДНК в ходе репликации нарушается.* Отсутствие ^{14}N -ДНК показывало, что часть атомов всех дочерних молекул ДНК происходила от родительской ДНК. Соотношение ^{14}N и ^{15}N в дочерних молекулах должно составлять 1:1, так как плотность гибридных молекул ДНК была средней между ^{14}N - и ^{15}N -ДНК.

После двух циклов репликации ДНК распределялась поровну в двух полосах. Одна из них - гибридная ДНК, другая - ^{14}N -ДНК. Меселсон и Сталь сделали из этих убедительных эксперимен-

тов вывод, «что азот молекул ДНК распределяется поровну между двумя физически separable структурами, что после удвоения каждая дочерняя молекула получает одну из этих структур и что эти структуры сохраняются интактными в течение многих удвоений». Полученные результаты прекрасно согласовывались с моделью репликации ДНК Уотсона—Крика (рис. 24.16).

24.7. Некоторые вирусы содержат на определенных стадиях жизненного цикла одноцепочечную ДНК

ДНК не всегда двухцепочечная молекула. Роберт Синсхеймер (Robert Sinsheimer) обнаружил, что ДНК фага ϕX174 , небольшого вируса, заражающего *E. coli*, - одноцепочечная молекула. Несколько экспериментальных фактов привели его к этому неожиданному выводу. Во-первых, соотношение оснований в ДНК фага ϕX174 не удовлетворяет правилу $[\text{A}] = [\text{T}]$ и $[\text{G}] = [\text{C}]$. Во-вторых, вязкость раствора ДНК фага ϕX174 значительно меньше вязкости раствора ДНК *E. coli* той же концентрации. Гидродинамические свойства ДНК фага ϕX174 соответствуют полимеру в конформации случайного клубка. В отличие от этого ДНК в форме двойной спирали ведет себя гидродинамически как очень жесткая палочка. В-третьих, аминокислоты оснований ДНК фага ϕX174 легко реагируют с формальдегидом, тогда как основания в двойной спирали ДНК почти недоступны для этого реактива.

Обнаружение этой одноцепочечной ДНК породило сомнения в универсальности схемы полуконсервативной репликации, предложенной Уотсоном и Криком. Однако вскоре было показано, что ДНК фага ϕX174 находится в одноцепочечном состоянии только на протяжении части жизненного цикла вируса. Синсхеймер обнаружил, что зараженные клетки *E. coli* содержат *двухцепочечную форму ДНК фага*

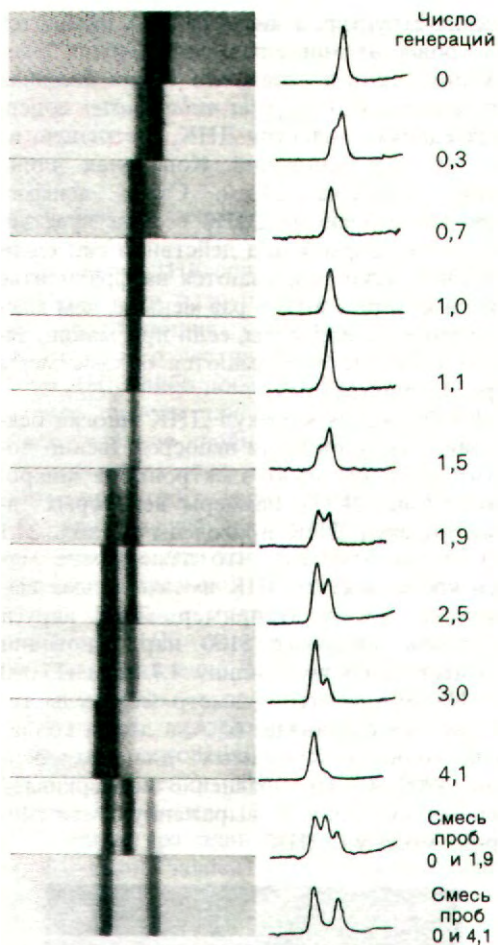


Рис. 24.15. Доказательство полуконсервативной репликации в клетках *E. coli* с помощью центрифугирования в градиенте плотности. Положение полосы ДНК зависит от содержания ^{14}N и ^{15}N . После 1,0 генерации все молекулы ДНК представляют собой гибриды, содержащие равное количество ^{14}N и ^{15}N . Родительская ДНК (^{15}N) после 1,0 генерации не обнаруживается. [Meselson M., Stahl F.W., Proc. Nat. Acad. Sci., 44, 671 (1958).]

φX174. Эта двухцепочечная ДНК называется *репликативной формой*, так как она служит матрицей для синтеза ДНК вирусного потомства. Вирусы, содержащие одноцепочечную РНК, также реплици-



Рис. 24.16. Схема полуконсервативной репликации. Родительская ДНК изображена зеленым, а ново-синтезированная - красным. [Meselson M., Stahl F.W., Proc. Nat. Acad. Sci., 44, 671 (1958).]

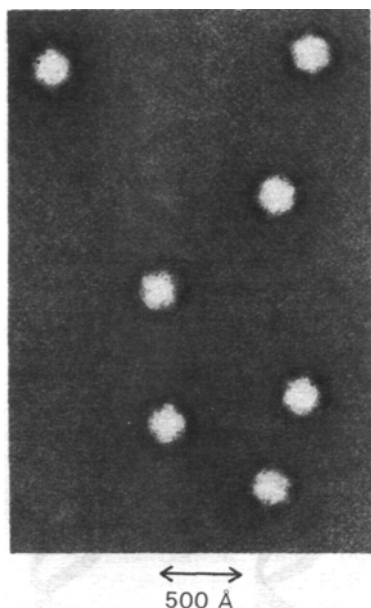


Рис. 24.17. Электронная микрофотография частиц вируса фХ174. (Печатается с любезного разрешения д-ра Robley Williams.)

руются через промежуточную двухцепочечную репликативную форму. Механизмы этих процессов подробнее рассматриваются в гл. 30. Здесь же важно лишь подчеркнуть, что эти исследования подтвердили всеобщность схемы репликации Уотсона—Крика. *Двухцепочечная ДНК (или РНК) - репликативная форма всех известных генов.*

24.8. Молекулы ДНК очень длинные

Прежде чем перейти к механизму репликации ДНК, представляющему собой сложный ферментативный процесс, рассмотрим некоторые свойства ДНК. Поразительная особенность молекул ДНК, встречающихся в природе, - их необычайная длина. *Хромосома E. coli представляет собой единую молекулу двухспиральной ДНК, содержащей 4 млн. пар оснований.* Масса этой молекулы ДНК $2,6 \cdot 10^6$ кДа. Она имеет *крайне асимметричную форму*: ее контурная длина $14 \cdot 10^6$ Å, а диаметр 20 Å. Контурная длина (1,4 мм) этой молекулы ДНК соответствует размерам макроскопи-

ческих структур, а диаметр 20 Å находится на уровне атомных размеров. Бруно Зимм (Bruno Zimm) показал, что самая большая хромосома у *Drosophila melanogaster* содержит единую молекулу ДНК, состоящую из $6,2 \cdot 10^7$ пар оснований. Контурная длина этой молекулы 2,1 см. Столь асимметричные молекулы ДНК весьма чувствительны к разрыву под действием сил сдвига. Они легко разрываются на фрагменты, масса которых в 1000 раз меньше, чем масса исходной молекулы, если при манипуляциях с ней не принимаются особые меры предосторожности.

Изображения молекул ДНК многих бактерий и вирусов были непосредственно получены с помощью электронного микроскопа (рис. 24.18). Размеры некоторых таких молекул ДНК приведены в табл. 24.1

Следует отметить, что даже самые маленькие молекулы ДНК имеют весьма вытянутую форму. Например, ДНК вируса полиомы содержит 5100 пар оснований и имеет контурную длину 1,7 мкм (17000 Å). Напомним, что диаметр молекулы гемоглобина составляет 65 Å, а длина коллагена, одного из самых длинных белков, - 3000 Å. Это сравнение подчеркивает огромную длину и выраженную асимметрию молекул ДНК.

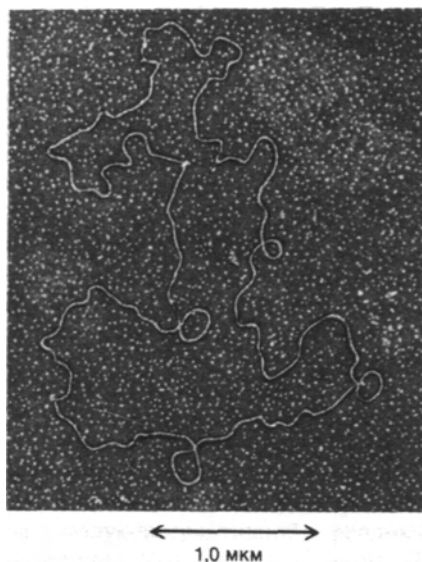


Рис. 24.18. Электронная микрофотография молекулы ДНК бактериофага λ (форма RFII). (Печатается с любезного разрешения д-ра Thomas Broker.)

Для измерения длин молекул нуклеиновых кислот применяется единица длины, равная 1000 пар нуклеотидов в случае двухцепочечных молекул нуклеиновых кислот (т.п.н., или kb - от англ. kilobase) или 1000 нуклеотидов в случае одноцепочечных молекул (т.н., или kb). 1 kb двухцепочечной ДНК имеет контурную длину 0,34 мкм и массу примерно 660 кДа.

24.9. Двойная спираль может быть обратимо расплавлена

Две цепи ДНК-спирали могут легко разойтись, если разрушить водородные связи, соединяющие спаренные основания. Этого можно достичь, либо нагревая раствор ДНК, либо добавляя в раствор кислоту или щелочь для ионизации оснований. Раскручивание двойной спирали называется *плавлением*, так как происходит мгновенно при строго определенной температуре. *Температура плавления* ($T_{пл}$) - это та температура, при которой разрушается половина спиральной структуры. Резкость этого перехода показывает, что двойная спираль ДНК - структура *высококооперативная*. Плавление ДНК легко регистрировать, измеряя ее поглощение при 260 нм. Нарушение межплоскостных взаимодействий пар оснований приводит к увеличению поглощения - эффект, называемый *гиперхромизмом* (рис. 24.19).

Температура плавления молекулы ДНК существенно зависит от ее нуклеотидного состава. Молекулы ДНК, богатые GC-парами оснований, имеют более высокие значения $T_{пл}$, чем молекулы, богатые AT-парами оснований (рис. 24.20). В общем $T_{пл}$

Таблица 24.1. Размеры некоторых молекул ДНК (Kornberg A., DNA replication, W. H. Freeman and Co., 1980, p. 20)

Организм	Число пар оснований, kb	Контурная длина, мкм
Вирусы		
Полиома или SV-40	5,1	1,7
Фаг λ	48,6	17
Фаг T2	166	56
Вirus коровьей оспы	190	65
Бактерии		
Микоплазма	760	260
<i>E.coli</i>	4000	1 360
Эукариоты		
Дрожжи	13500	4600
Дрозифила	165000	56000
Человек	2900000	990000

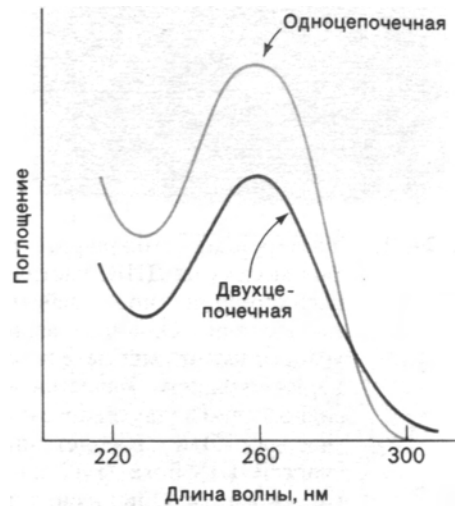


Рис. 24.19. При плавлении двойной спирали, когда она переходит в одноцепочечную форму, поглощение раствора ДНК при 260 нм возрастает.

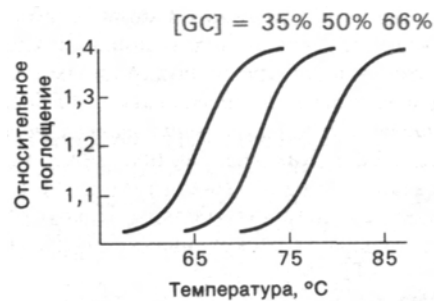


Рис. 24.20. Кривые плавления различных ДНК. На графике отложено относительное поглощение при 260 нм в зависимости от температуры (поглощение при 25°C принято за 1). $T_{пл}$ равна 69°C для ДНК *E. coli* (50% GC-пар) и 76°C для ДНК *P. aeruginosa* (68% GC-пар).

24. ДНК: генетическая роль, структура и репликация

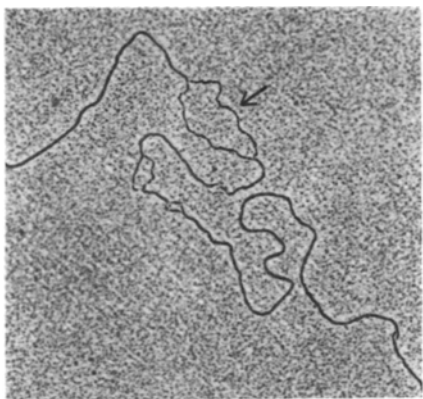


Рис. 24.21. Электронная микрофотография молекулы ДНК, частично расплетенной под действием щелочи. Одноцепочечные участки имеют вид петель, которые окрашены менее интенсивно, чем двухцепочечные участки. Эти расплетенные участки ДНК богаты АТ-парами оснований. Один из них помечен стрелкой. [Inman R. B., Schnos M., J. Mol. Biol., **49**, 93 (1970).]

ДНК многих видов повышается линейно от 77 до 100°C с увеличением содержания GC-пар от 20 до 78%. GC-пары стабильнее АТ-пар, так как в них основания удерживаются вместе тремя водородными связями, а не двумя. Следовательно, АТ-богатые области ДНК должны плавиться первыми (рис. 24.21). Как мы увидим ниже, *in vivo* двойная спираль расплетается под действием специальных белков. Некоторые из них вызывают раскручивание ДНК, гидролизую АТР (разд. 24.21).

Разделенные комплементарные цепи ДНК спонтанно реассоциируют с образованием двойной спирали, если температура становится ниже $T_{пл}$. Этот процесс ренатурации иногда называют *отжигом*. Скорость реассоциации зависит от концентрации комплементарных последовательностей (разд. 29.10). Легкость, с которой плавятся и реассоциируют двойные спирали, имеет критическое значение для выполнения ДНК ее биологических функций.

Часть IV. Информация

24.10. Некоторые молекулы ДНК имеют кольцевую форму

Методом электронной микроскопии было показано, что интактные молекулы ДНК из многих источников замкнуты в кольцо (рис. 24.18). Открытие того факта, что *E. coli* имеет кольцевую хромосому, не было неожиданностью. Оно было предсказано на основе генетических исследований, показавших, что карта генетического сцепления этой бактерии является кольцевой. Термин «кольцевая» означает лишь, что цепь ДНК непрерывна, и отнюдь не относится к ее геометрической форме. *In vivo* молекулы ДНК всегда имеют весьма компактную форму. В связи с этим следует отметить, что хромосома *E. coli* примерно в 1000 раз длиннее, чем клетка бактерии.

Не все молекулы ДНК имеют кольцевую форму. Например, ДНК бактериофага Т7 является *линейной*. Молекулы ДНК некоторых вирусов, таких, как бактериофаг λ , претерпевают *взаимопревращения линейной и кольцевой форм*. В вирусной частице присутствует линейная форма, а в клетке-хозяине - кольцевая (разд. 30.16).

24.11. Кольцевые двухспиральные молекулы ДНК могут находиться в суперспирализованном состоянии

При превращении линейной двухцепочечной ДНК в замкнутую кольцевую молекулу она приобретает новое свойство. Джером Виноград (Jerome Vinograd) установил, что ось двойной спирали ДНК может сама быть закручена в *суперспираль*. Эта суперспираль может быть закручена в правую или в левую сторону (рис. 24.22). Термины «суперспирализованная», «сверхскручен-

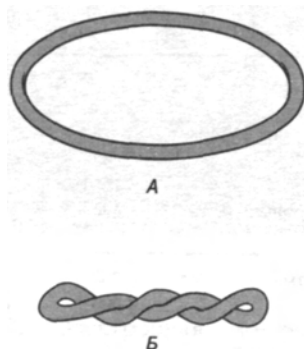


Рис. 24.22. Схематическое изображение релаксированной (А) и суперспирализованной (Б) ДНК.

ная», «суперспиральная», «суперскрученная» и «сверхспиральная» - синонимы. Кольцевую ДНК, совершенно лишенную суперспиральных витков, называют *релаксированной*. Для того чтобы превратить релаксированную ДНК в суперспирализованную, необходимо затратить определенную энергию. Например, энергия, затрачиваемая на образование 15 суперспиральных витков в одной молекуле ДНК вируса SV-40 (ее контурная длина 1,7 мкм), составляет около 100 ккал/моль. Энергия напряжения суперспирализованной ДНК (энергия суперспирализации) примерно пропорциональна квадрату числа суперспиральных витков.

Суперспирализация, по-видимому, выполняет две биологические функции. Во-первых, *суперспирализованная ДНК имеет более компактную форму, чем релаксированная ДНК такой же длины* (рис. 24.23). Суперспирализация может играть определенную роль в упаковке ДНК. Во-вторых, Суперспирализация может влиять на степень расплетания двойной спирали и, следовательно, на ее взаимодействия с другими молекулами. Точнее, *отрицательная суперспирализация может приводить к раскручиванию двойной спирали*. Интересно отметить, что почти все кольцевые молекулы ДНК, встречающиеся в природе, отрицательно суперспирализованы.

Важная характеристика замкнутой кольцевой ДНК - ее порядок зацепления L (от англ. linking). Число L указывает, сколько раз одна цепь пересекает другую цепь, если их спроецировать на плоскость. Число L должно быть целым. Кручение T (от англ. twisting) и величина суперспирализации W (от англ. writhe) связаны между собой уравнением

$$L = W + T,$$

т.е. находятся в обратной зависимости.

Порядок зацепления - топологическая характеристика; она может изменяться, лишь когда в одну или в обе цепи кольцевой ДНК вносятся разрывы. Действительно, были выделены ферменты, которые каталитически изменяют величину L . Каталитическую активность таких *топоизомераз* легко выявить с помощью гель-электрофореза, так как суперспирализованная ДНК более компактна и поэтому имеет большую подвижность, чем релаксированная ДНК (рис. 24.24).

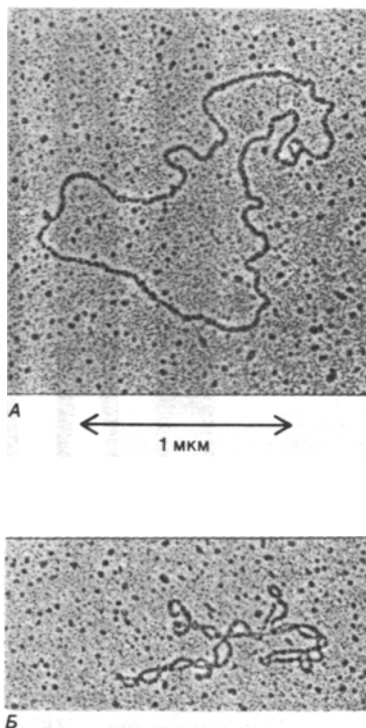


Рис. 24.23. Электронные микрофотографии митохондриальной ДНК: *А* - релаксированная кольцевая форма; *Б* - суперспирализованная кольцевая форма. (Печатается с любезного разрешения д-ра David Clayton.)

24.12. Открытие ДНК-полимеразы

Перейдем теперь к молекулярному механизму репликации ДНК. Артур Корнберг (Arthur Kornberg) и его коллеги в 1955 г. начали поиск фермента, синтезирующего ДНК. Вскоре этот поиск увенчался успехом, главным образом потому, что при планировании экспериментов были приняты три правильных решения, т.е. был сделан правильный выбор между несколькими возможностями.

1. Что представляют собой *активированные предшественники* ДНК? Корнберг и его коллеги сделали правильное предположение, что активированные промежуточные продукты синтеза *ДНК - дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты*. В основе это-

24. ДНК: генетическая роль, структура и репликация



Рис. 24.24. Фотографии гелей, на которых видна релаксация суперспирализованной ДНК вируса SV-40. Дорожка *А* - суперспирализованная ДНК с большим числом отрицательных витков. При инкубации ДНК с топоизомеразой в течение 5 мин (*Б*) и 30 мин (*В*) образуется ряд полос с более низкой степенью суперспирализации. [Keller W., Proc. Nat. Acad. Sci., 72, 2553 (1975).]

го предположения лежали два соображения. Во-первых, пути биосинтеза пуринов и пиримидинов приводят к образованию нуклеозид-5'-фосфатов (а не нуклеозид-3'-фосфатов). Во-вторых, активированным промежуточным продуктом синтеза пирофосфатной связи в таких коферментах, как NAD^+ , FAD и CoA, является АТФ.

2. Что может служить критерием *синтеза ДНК*? Предполагалось, что абсолютное количество ДНК, синтезированной в первоначальных экспериментах, должно быть весьма невелико, главным образом из-за обилия нуклеаз. Поэтому нужен был какой-то чувствительный тест. Был разработан такой тест с использованием *радиоактивных нуклеотидов-предшественников*. Включение этих предшественников в ДНК обнаруживали путем измерения радиоак-

тивности в осадке, полученном после обработки инкубационной смеси кислотой. В основе этого метода лежит тот факт, что ДНК осаждается кислотами, например трихлоруксусной кислотой, а нуклеотиды-предшественники остаются в растворе.

3. *Какие клетки* следует выбрать для исследования? После того как первоначальные эксперименты с экстрактами животных клеток дали отрицательные результаты, выбор пал на бактерии *E. coli*, поскольку деление этих клеток происходит всего лишь за 20 мин (время генерации), и, следовательно, их можно выращивать в больших количествах. Как и предполагалось, эта бактерия исключительно богата ферментами, участвующими в синтезе ДНК.

Экстракт *E. coli* инкубировали с радиоактивным дезокситимидин-5'-трифосфатом. Радиоактивность этого ^{14}C -меченного предшественника составляла $1 \cdot 10^6$ имп./мин. Радиоактивность осадка, полученного добавлением к инкубационной смеси кислоты, составляла всего 50 имп./мин. Было синтезировано лишь несколько пикомолей ДНК, но этим было положено начало. Корнберг писал: «Хотя количество нуклеотида, включившегося в состав нуклеиновой кислоты, было ничтожным, оно было существенно выше уровня фона. Мы попробовали забить клин в эту узенькую щелчку.

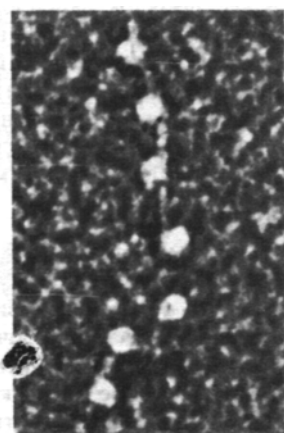


Рис. 24.25. Электронная микрофотография молекул ДНК-полимеры (сферические структуры), связанных с молекулой ДНК (тонкая нить). (Печатается с любезного разрешения д-ра Jack Griffith.)

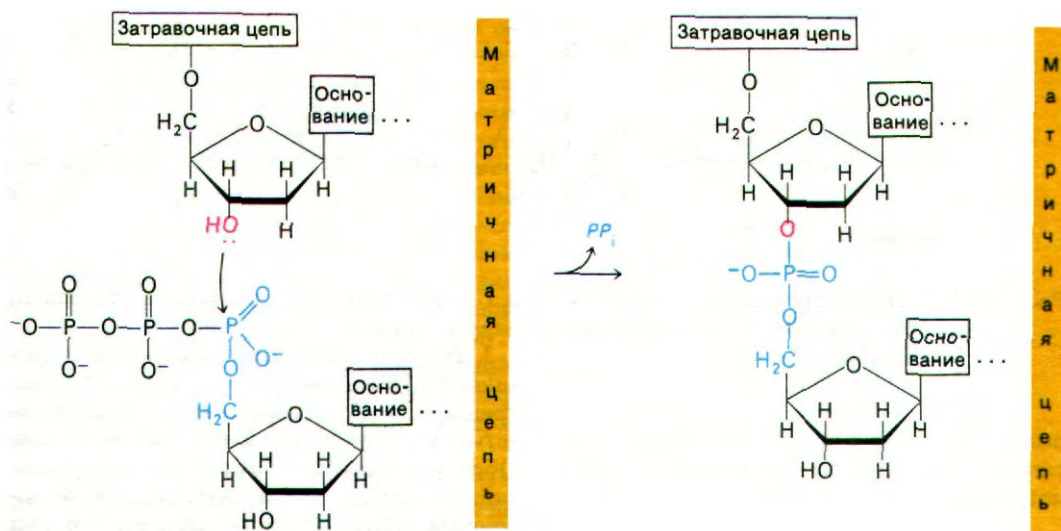


Рис. 24.26. Реакция элонгации цепи, катализируемая ДНК-полимеразой.

Молотком нам служила очистка фермента-метод, отработанный при изучении спиртового брожения».

Этот новый фермент был назван ДНК-полимеразой (рис. 24.25). Теперь его называют *ДНК-полимеразой I*, так как с тех пор были выделены другие ДНК-полимеразы. После десяти лет напряженной работы в лаборатории Корнберга ДНК-полимераза I была очищена до гомогенного состояния и детально охарактеризована. Насколько велики были масштабы проделанной работы, говорит тот факт, что для получения 500 мг чистого фермента необходимо было взять 100 кг клеток *E.coli*.

ДНК-полимераза I — это единая полипептидная цепь с массой 109 кДа. Она катализирует *последовательное присоединение дезоксирибонуклеиновых звеньев к цепи ДНК*:



Для синтеза цепи ДНК ДНК-полимеразе I необходимы следующие компоненты:

1. В среде должны присутствовать все четыре дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфата: dATP, dGTP, dTTP и dCTP. В дальнейшем мы будем обозначать эти дезоксирибонуклеозидтрифосфаты общим символом dNTP. Кроме того, необходимы ионы Mg^{2+} .

2. ДНК-полимераза I присоединяет де-

зоксирибонуклеотиды к 3'-гидроксильному концу предсуществующей цепи ДНК (или РНК). Другими словами, необходима затравочная цепь, или *затравка*, со свободной 3'-гидроксильной группой.

3. Необходима *матричная ДНК*. Матрицей может служить как одно- так и двухцепочечная ДНК. Двухцепочечная ДНК служит эффективной матрицей лишь в том случае, если ее сахарофосфатный остов разорван в одном или нескольких местах.

Реакция элонгации (удлинения) цепи, катализируемая ДНК-полимеразой, происходит путем *нуклеофильной атаки 3'-ОН-концом матрицы ближайшего к рибозе атома фосфора очередного дезоксирибонуклеозидтрифосфата*. В результате образуется фосфодиэфирный мостик и одновременно высвобождается пиррофосфат (рис. 24.26). Последующий гидролиз пиррофосфата обеспечивает дальнейшую полимеризацию. Такое смещение общего состояния равновесия было бы невозможно, если бы активированными промежуточными продуктами служили нуклеозиддифосфаты. Именно в этом мы усматриваем убедительную причину преобладания нуклеозидтрифосфатов по сравнению с дифосфатами в качестве активированных предшественников в биосинтетических реакциях. *Элонгация цепи ДНК происходит в направлении 5'→3'* (рис. 24.27). За секунду одна молекула ДНК-полимеразы I присоединяет примерно 10 нуклеотидов. Полимеризация процес-

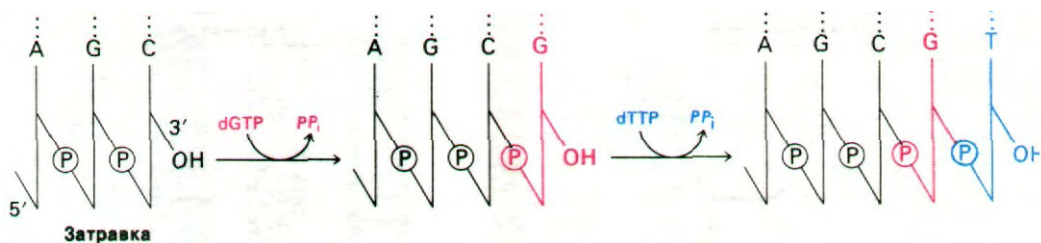


Рис. 24.27. ДНК-полимеразы катализируют рост цепей ДНК в направлении 5'→3'.

сивна, т. е. фермент присоединяет много нуклеотидов, оставаясь связанным с одной матрицей.

24.13. ДНК-полимераза получает инструкции от матрицы

ДНК-полимераза катализирует образование фосфодиэфирной связи только в том случае, если основание очередного нуклеотида комплементарно соответствующему основанию матричной цепи. Если же основание очередного нуклеотида не образует уотсон-криковской пары с соответствующим основанием матричной цепи, вероятность образования ковалентной связи очень низка. Следовательно, ДНК-полимераза — фермент, направляемый матрицей. Она была открыта первой из ферментов такого типа.

Ряд экспериментов доказывает, что ДНК-полимераза получает инструкции от матрицы.

1. Первым доводом в пользу этого утверждения послужил тот факт, что *значительный синтез ДНК идет только в присутствии всех четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и матричной ДНК*,

2. ДНК-полимераза может включать в ДНК некоторые аналоги оснований. Например, урацил или 5-бром урацил может замещать тимин. Гипоксантин может замещать гуанин. Способность аналогов замещать основания высоко специфична. Согласно правилу замещения, тот или иной аналог может включаться лишь при условии, что он способен образовать уотсон-криковскую пару с основанием, комплементарным замещаемому основанию. Так, гипоксантин может замещать G (но не A, T

и C), поскольку он образует подходящую пару оснований с цитозином.

3. *Нуклеотидный состав* новосинтезированной ДНК зависит от характера матрицы, а не от относительного количества четырех нуклеотидов-предшественников. Образующаяся ДНК имеет тот же нуклеотидный состав, что и двухспиральная матричная ДНК. Из этого следует, что под действием ДНК-полимеразы реплицируются обе цепи матричной ДНК.

4. Наиболее убедительным доводом служат данные о том, что ДНК фага φX174, реплицированная *in vitro* ДНК-полимеразой I, полностью инфекционна. Следовательно, частота, с которой этот фермент делает ошибки, очень низка.

24.14. ДНК-полимераза I исправляет ошибки в ДНК

ДНК-полимераза обладает еще одним видом ферментативной активности: в определенных условиях она способна расщеплять цепи ДНК. ДНК-полимераза постепенно гидролизует цепь ДНК с 3'-гидроксильного конца. При этом отщепляются мононуклеотиды. Таким образом, *ДНК-полимераза I является также 3'→5'-экзонуклеазой* (рис. 24.28). Удаляемый нуклеотид должен иметь свободный 3'-ОН-конец и не должен находиться в составе двойной спирали. Является ли такая экзонуклеазная активность фермента нежелательным побочным эффектом, или она каким-то образом участвует в биологическом действии ДНК-полимеразы? Эксперименты с использованием химически синтезированных полинуклеотидов с некомплементарным остатком на конце затравки показали, что 3'→5'-экзонуклеазная активность выполняет в процессе полимеризации функцию редактирования. Рассмотрим полимер, показанный на рис. 24.28, в котором последовательность остатков dT образует двойную спираль с более длинным полимером dA. На 3'-конце этой poly(dT)-последовательности имеется один остаток dC, который

не образует водородных связей, так как он не комплементарен dA. При добавлении ДНК-полимеразы и dTTP этот некомплементарный остаток dC отщепляется раньше, чем начинается присоединение остатков dT. Эксперименты с использованием множества различных синтетических полимеров показали, что *ДНК-полимераза I всегда удаляет некомплементарные остатки на конце затравки, прежде чем продолжать полимеризацию*. Если на конце находится комплементарное основание и в среде присутствуют активированные предшественники, гидролиза практически не происходит. Полимеризация предотвращает гидролиз с 3'-конца.

По всей вероятности, репликация ДНК идет с высокой точностью, так как *спаривание оснований проверяется дважды*. В тех случаях, когда пара оснований не вмещается в двойной спирали, полимеризация обычно не идет. Однако, если на этом этапе все-таки произойдет ошибка, она может быть исправлена раньше, чем будет присоединен следующий нуклеотид. Таким образом, ДНК-полимераза I проверяет результат каждого проведенного акта полимеризации, прежде чем перейти к следующему.

Кроме того, ДНК-полимераза I может гидролизовать ДНК, начиная с 5'-конца цепи. Эта *5'→3'-нуклеазная* активность (рис. 24.29) существенно отличается от обсуждавшейся выше *3'→5'-экзонуклеазной* активности. Во-первых, расщепляемая связь должна находиться в двухспиральном участке. Во-вторых, может происходить расщепление как концевой фосфодиэфирной связи, так и связи, расположенной на расстоянии нескольких нуклеотидов от 5'-конца (который может иметь свободную или фосфорилированную гидроксильную группу). В-третьих, *5'→3'-нуклеазная* активность увеличивается, если одновременно идет синтез ДНК. В-четвертых, активный участок *5'→3'-нуклеазной* активности четко отделен от активных участков полимеризации и *3'→5'-гидролиза*. ДНК-полимеразу I можно расщепить протеолитическими ферментами на фрагмент с массой 36 кДа, содержащий всю *5'→3'-нуклеазную* активность, и фрагмент с массой 75 кДа, содержащий всю полимеразную и всю *3'→5'-экзонуклеазную* активность. Таким образом, *ДНК-полимераза I содержит по меньшей мере два*



Рис. 24.28. *3'→5'-экзонуклеазная* активность ДНК-полимеразы I.



Рис. 24.29. *5'→3'-нуклеазная* активность ДНК-полимеразы I.

различных фермента в одной полипептидной цепи. 5'→3'-нуклеаза дополняет 3'→5'→5'-экзонуклеазную активность, исправляя ошибки другого рода. Например, 5'→3'-нуклеаза участвует в вырезании пири-

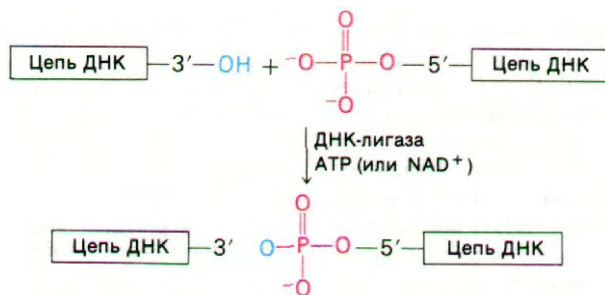


Рис. 24.30. ДНК-лигаза катализирует соединение двух цепей ДНК, входящих в состав одной двухспиральной молекулы.

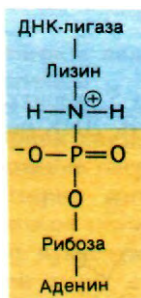


Рис. 24.31. Ковалентный промежуточный комплекс фермент—АМР.

мидиновых димеров, образующихся при облучении ДНК ультрафиолетом (разд. 24.24). Более того, 5'—>3'-нуклеазная активность играет ключевую роль в самой репликации ДНК (разд. 24.19).

24.15. ДНК-лигаза соединяет фрагменты ДНК

ДНК-полимераза I может присоединять дезоксирибонуклеотиды к затравочной цепи, но она не способна катализировать соединение двух цепей ДНК или замыкание одной цепи ДНК. Обнаружение кольцевой ДНК указывало, что такой фермент должен существовать. В 1967 г. в нескольких лабораториях одновременно была открыта *ДНК-лигаза* - фермент, катализирующий образование фосфодиэфирной связи между двумя цепями ДНК (рис. 24.30). Фермент этот активен при наличии *свободной ОН-группы на 3'-конце* одной цепи ДНК и

фосфатной группы на 5'-конце другой. Образование фосфодиэфирной связи между этими группами—эндергоническая реакция. Следовательно, для *реакции соединения цепей требуется источник энергии*. У *E. coli* и других бактерий эту роль выполняет NAD^+ , тогда как в клетках животных и зараженных бактериофагом клетках данная реакция осуществляется за счет энергии *АТР*.

Заслуживает внимания и еще один аспект работы ДНК-лигазы: ДНК-лигаза не может соединить две молекулы одноцепочечной ДНК. *Цепи ДНК, соединяемые ДНК-лигазой, должны быть частью двухцепочечной молекулы ДНК*. Исследования модельных систем дают основание думать, что ДНК-лигаза образует фосфодиэфирную связь только в том случае, если вблизи от места разрыва имеется хотя бы несколько пар оснований. В действительности ДНК-лигаза заделывает одноцепочечные разрывы в остове двухспиральной ДНК. Этот процесс необходим для *нормального синтеза ДНК, для репарации поврежденной ДНК и для сращивания (сплайсинга) цепей ДНК при генетической рекомбинации*.

Рассмотрим механизм этой реакции, установленный Робертом Леманом (Robert Lehman). АТР или NAD^+ вступают в реакцию с ДНК-лигазой и образуют *ковалентный комплекс фермент—АМР*, в котором АМР связан с ϵ -аминогруппой лизинового остатка фермента фосфоамидной связью (рис. 24.31). Остаток АМР активирует фосфатную группу на 5'-конце ДНК. Последняя стадия — *нуклеофильная атака активированного атома фосфора 3'-ОН-группой*. В результате образуется фосфодиэфирная связь и освобождается АМР. Движущая сила этой последовательности реакций — гидролиз пирогосфата, отщепляющегося при образовании комплекса фермент—аденилат. Таким образом, *на образование фосфодиэфирной связи в остове ДНК расходуют*

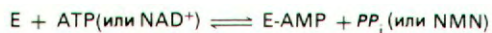


Рис. 24.32. Механизм реакции, катализируемой ДНК-лигазой.

ся две богатые энергией фосфатные связи. если источником энергии служит АТР.

24.16. Открытие ДНК-полимераз II и III

Мы видели, что ДНК-полимераза I может синтезировать и репарировать ДНК *in vitro*. Выполняет ли она эти функции *in vivo*? Вопрос вполне правомерный, так как фермент не всегда способен осуществлять *in vivo* ту реакцию, которую он катализирует *in vitro*. Условия, существующие в клетке, могут отличаться от условий, используемых при постановке опытов *in vitro*, и, кроме того, в клетке могут присутствовать другие ферменты. Действительно, в клетке *E.coli* имеются по меньшей мере две другие ДНК-полимеразы, названные полимеразами II и III, которые были обнаружены примерно через 15 лет после открытия ДНК-полимеразы I. Чем же объясняется такое запаздывание? Дело в том, что активность ДНК-полимераз II и III маскировалась высокой активностью полимеразы I.

Ситуация изменилась в 1969 г., когда Паула Де Лусия и Джон Кэрнс (Paula DeLucia, John Cairns) выделили мутантную форму *E.coli*, в экстракте которого обнаруживалось от 0,5 до 1% нормальной полимеразной активности ДНК-полимеразы I по сравнению с обычными клетками. Этот мутант (обозначенный *polA 1*) размножался с такой же скоростью, как и родительский штамм. Кроме того, многие фаги размножались в клетках *polA 1* так же хорошо, как и в родительских клетках. Однако этот мутант гораздо быстрее погибал под действием ультрафиолетового облучения. К тому же мутант *polA 1* был более чувствителен к летальному действию химического мутагена метилметансульфоната. Де Лусия и Кэрнс сделали вывод, что репликация ДНК в клетках полученного ими мутанта *polA 1* идет нормально, но репарация ДНК существенно нарушена. Они предположили, что для син-

теза ДНК нужна какая-то другая полимераз, отличная от ДНК-полимеразы I.

Низкий фон активности полимеразы I у мутанта *polA 1* облегчил поиск новых ДНК-полимераз. Вскоре в нескольких лабораториях были выделены и охарактеризованы два таких фермента. ДНК-полимеразы II и III подобны полимеразе I в следующих отношениях:

1. Они катализируют направляемый матрицей синтез ДНК из предшественников дезоксирибонуклеозидтрифосфатов.
2. Для проявления их активности необходима затравка со свободной 3'-ОН-группой,
3. Синтез идет в направлении 5'→3'.
4. Они обладают 3'→5'-экзонуклеазной активностью. ДНК-полимераза III (но не II) является также 5'→3'-нуклеазой.

Эти полимеразы различаются по характеру предпочитаемых ими матриц. Для полимераз II и III оптимальными матрицами служат двухцепочечные ДНК, имеющие короткие одноцепочечные пробелы. Полимераза I, наоборот, предпочитает протяженные одноцепочечные участки, соседствующие с двухспиральными участками. Максимальные скорости катализа *in vitro* для этих ферментов также различаются: полимеразы I присоединяет 10 нуклеотидов в секунду, а полимеразы II - 0,5 и полимеразы III - 150 нуклеотидов в секунду. В физиологически активном состоянии ДНК-полимераза III ассоциирована с некоторыми другими белками. Этот мультисубъединичный комплекс называют *голоферментом ДНК-полимеразы III*.

Какова роль этих полимераз *in vivo*? Вскоре мы расскажем о том, что мультиферментный комплекс, содержащий ДНК-полимеразу III, синтезирует большую часть новообразующейся ДНК, а ДНК-полимераза I удаляет затравку и заполняет пробелы. Роль ДНК-полимеразы II пока не установлена. Проведенные в последнее время био-

24. ДНК: генетическая роль, структура и репликация

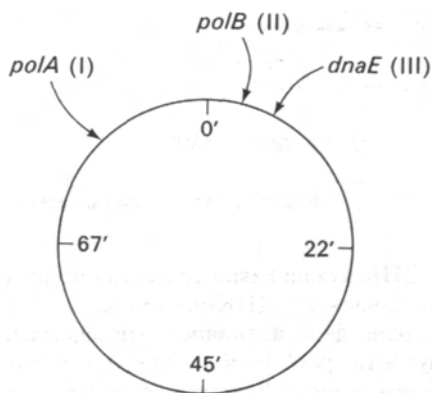


Рис. 24.33. Положение структурных генов трех ДНК-полимераз *E. coli*. Ген ДНК-полимеразы I расположен в локусе *polA*, ген ДНК-полимеразы II - в локусе *polB* и ген ДНК-полимеразы III - в локусе *dnaE*.

химические и генетические исследования показали, что, кроме ДНК-полимераз I и II и ДНК-лигазы, для репликации ДНК в клетке *E. coli* необходимо более 10 белков. Прежде чем рассмотреть взаимодействие этих белков с ДНК, познакомимся в общих чертах с репликацией на уровне целой хромосомы.

24.17. Расплетание родительской ДНК и синтез новой ДНК происходят в репликационной вилке

Изображения ДНК во время репликации были получены с помощью радиоавтографии и электронной микроскопии. При радиоавтографии изображение образуется в результате распада подходящего изотопа, например трития. Испускаемые электроны взаимодействуют с гранулами серебра фотографической эмульсии. После проявления пленки возникают черные точки. Метод радиоавтографии имеет довольно низкую разрешающую способность - порядка нескольких сотен ангстрем. Однако у этого метода есть определенное преимущество: он позволяет видеть лишь те молекулы, которые содержат метку. Для того чтобы сделать ДНК видимой при радиоавтографии, в нее включают тимин или тимидин, меченный тритием.

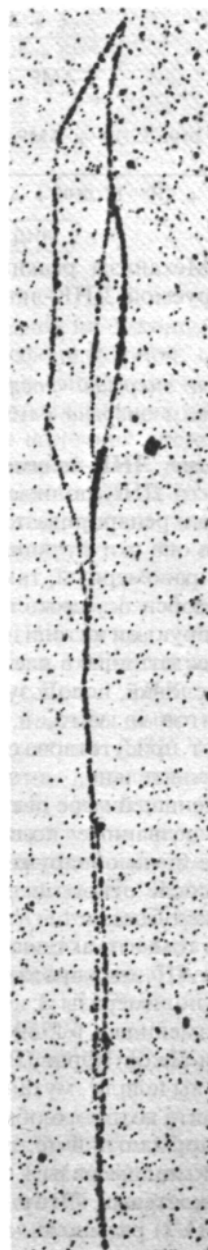


Рис. 24.34. Радиоавтограф реплицирующейся ДНК *E. coli*. (Печатается с любезного разрешения д-ра John Cairns.)

На радиоавтографах и электронных микрофотографиях видно, что реплицирующаяся ДНК *E. coli* имеет форму замкнутого кольца с внутренней петлей (рис. 24.34). Молекулы такой формы называют тета-структурами, так как они напоминают греческую

букву θ (рис. 24.35). Тета-структуры показывают, что молекулы ДНК сохраняют во время репликации кольцевую форму. Разрешение этого метода недостаточно велико, чтобы различить свободные концы. Однако очевидно, что длинных нитей одноцепочечной ДНК в молекуле нет. Таким образом, эти изображения позволяют отвергнуть механизм репликации, согласно которому цепи родительской ДНК сначала полностью раскручиваются, и только затем используются в качестве матриц при синтезе новой ДНК. Напротив, синтез новой ДНК сопряжен с одновременным раскручиванием родительской ДНК. Участок, где происходит одновременное расплетание и синтез, называется *репликационной вилкой*.



Рис. 24.35. Схематическое изображение кольцевой хромосомы *E. coli* во время репликации. Синими линиями в этой тета-структуре показана родительская ДНК, красными — новообразованная ДНК.

24.18. Репликация ДНК начинается в строго определенном месте и продолжается последовательно в обоих направлениях

Начинается ли репликация ДНК *E. coli* в произвольном месте хромосомы, или же в хромосоме имеется определенный участок инициации? Репликация ДНК — строго регулируемый процесс, поэтому *a priori* кажется гораздо более вероятным, что она начинается в определенном месте. Действительно, как показали работы по определению относительного числа различных генов в условиях быстрого синтеза ДНК, репликация в клетках *E. coli* начинается в одном определенном месте хромосомы. Рассмотрим два гена — *a* и *b*. Предположим, что ген *a* расположен вблизи от точки начала репликации, а ген *b* — вблизи от конца. Тогда ген *a* будет реплицироваться намного раньше, чем ген *b*. В быстро растущей культуре на один ген *b* будет приходиться примерно два гена *a*. Если же, наоборот, репликация ДНК начинается в случайной точке, количество генов *a* и *b* будет одинаковым. Относительное число генов было определено с помощью метода гибридизации, который рассматривается ниже (разд. 25.5). Результаты этих экспериментов ясно показали, что относительное число генов действительно зависит от их положения на карте (рис. 24.36). Эти данные позволили сделать следующие выводы.

1. Репликация начинается в строго определенном уникальном участке — вблизи гена *ilv*, локализованного на 74' на стандартной генетической карте *E. coli*.

2. Репликация идет одновременно в обоих направлениях с примерно одинаковой



Рис. 24.36. Относительные количества различных генов в условиях быстрого синтеза ДНК у *E. coli* в зависимости от их положения на генетической карте.

скоростью. Другими словами, *существуют две репликационные вилки: одна движется по часовой стрелке, другая - против часовой стрелки.*

3. Две репликационные вилки встречаются вблизи маркера *trp* (25' на генетической карте) - в точке, почти диаметрально противоположной началу репликации.

Еще одно доказательство двунаправленности репликации ДНК у *E.coli* было получено методом радиоавтографии. Для этого вначале репликацию проводили в среде, содержащей тимин, меченный тритием до умеренной удельной радиоактивности. Через несколько минут инкубации бактерии перенесли в среду, содержащую *высокомеченный* тритием радиоактивный тимин. Пробы с двумя различными уровнями радиоактивности использовались для того, чтобы получить на радиоавтографах два типа цепочек зерен серебра: цепочки с низкой плотностью зерен, соответствующие ДНК, синтезированной вначале, и цепочки с высокой плотностью, соответствующие ДНК, синтезированной позже. Если бы репликация шла в одном направлении, были бы видны цепочки с высокой плотностью зерен на одном конце и низкой плотностью на другом. Если же репликация идет в двух направлениях, середина каждого отпечатка ДНК должна была бы иметь низкую плотность зерна, а концы - высокую (рис. 24.37). Радиоавтографы дали наглядный ответ (рис. 24.38). Цепочки зерен серебра (отпечатки ДНК) во всех случаях имели более высокую плотность зерен на обоих концах, чем посередине, указывая тем самым, что *репликация хромосомы E.coli идет в двух направлениях.*

24.19. Одна цепь ДНК синтезируется прерывисто

Вернемся к взаимодействию молекул при репликации. В области репликационной вилки обе цепи родительской ДНК служат матрицами для синтеза новой ДНК. Напомним, что цепи родительской ДНК антипараллельны. Следовательно, *общее* направление синтеза ДНК должно быть 5'→3' для одной из дочерних цепей и 3'→5' для другой (рис. 24.39). Однако все известные ДНК-полимеразы синтезируют ДНК в направлении 5'→3', а не 3'→5'. Как же тогда происходит



Рис. 24.37. Предполагаемые результаты радиоавтографии в случае одно- и двунаправленной репликации, если бактерий переносят со среды, содержащей тимин с умеренной радиоактивностью, на среду с высокорadioактивным тимином.

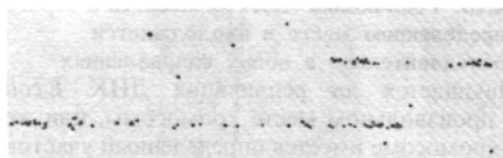


Рис. 24.38. Радиоавтограф ДНК *E. coli* во время репликации (условия опыта указаны в подписи к рис. 24.37). Наблюдаемое распределение зерен серебра показывает, что репликация идет в двух направлениях. [Prescott D. M., Kuempel P. L., Proc. Nat. Acad. Sci, 69, 2842 (1972).]

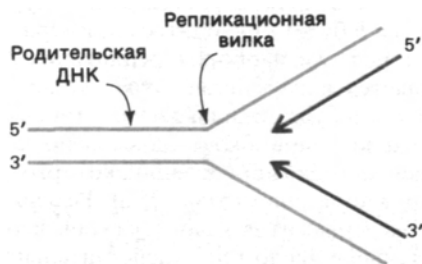


Рис. 24.39. При *низком разрешении* кажущееся направление репликации ДНК будет 5'→3' для одной дочерней цепи и 3'→5' для другой. На самом деле обе цепи синтезируются в направлении 5'→3', как показано на рис. 24.40.

кажущийся (при низкой разрешающей способности метода) рост одной из дочерних цепей в направлении $3' \rightarrow 5'$?

Проблема была решена Рейджи Оказаки (Reiji Okazaki), который обнаружил, что значительная часть новосинтезированной ДНК существует в виде коротких фрагментов. Такие фрагменты длиной около 1000 нуклеотидов (они называются фрагментами Оказаки) существуют в течение непродолжительного времени в непосредственной близости от репликационной вилки. По мере прохождения репликации эти фрагменты соединяются друг с другом ковалентно под действием ДНК-лигазы и образуют одну из дочерних цепей (рис. 24.40). Другая новая цепь синтезируется непрерывно или почти непрерывно. Та цепь, которая образуется из фрагментов Оказаки, называется *отстающей цепью*, а та, что синтезируется без разрывов или почти без разрывов, - *ведущей цепью*. И фрагменты Оказаки, и ведущая цепь синтезируются в направлении $5' \rightarrow 3'$. Прерывистая сборка отстающей цепи позволяет путем полимеризации в направлении $5 \rightarrow 3'$ на атомном уровне получать общий рост цепи в направлении $3' \rightarrow 5'$.



Рис. 24.40. Схематическое изображение репликационной вилки. Обе цепи ДНК синтезируются в направлении $5' \rightarrow 3'$. Ведущая цепь синтезируется непрерывно, а отстающая - в виде коротких фрагментов (фрагменты Оказаки).

24.20. Затравкой синтеза ДНК служит РНК

Как начинается синтез ДНК? Напомним, что всем ДНК-полимеразам для иницирования синтеза ДНК необходима затравка со свободной $3'$ -ОН-группой. Что служит затравкой при синтезе ведущей цепи и фрагментов Оказаки? Важным толчком к решению этого вопроса послужило наблюдение, что для инициации синтеза ДНК необходим синтез РНК. На основе этого открытия было высказано предположение, что РНК, очевидно, служит затравкой в синтезе ДНК, так как уже было известно, что РНК-полимеразы способны начинать синтез цепей *de novo*. Затем было показано, что *новообразующаяся ДНК ковалентно связана с коротким фрагментом РНК, который и служит затравкой. Итак, РНК-затравка в синтезе ДНК.*

По всей вероятности, репликация ДНК в клетке *E.coli* происходит, как показано на рис. 24.41.

1. Особая РНК-полимераза (ее называют *праймаза*) синтезирует короткую цепь РНК (примерно 10 нуклеотидов), комплементарную одной из цепей ДНК-матрицы. В отличие от ДНК-полимеразы праймаза не ну-

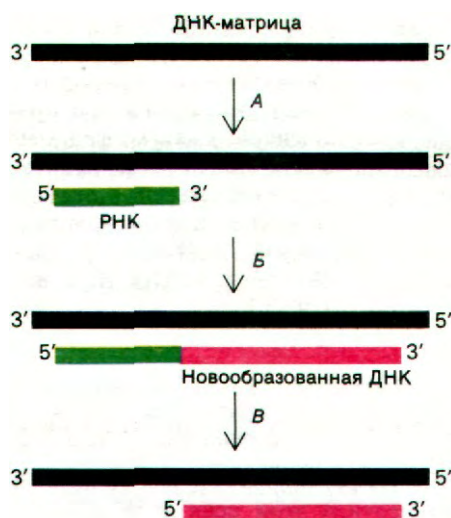


Рис. 24.41. Инициация синтеза ДНК. А - праймаза синтезирует короткую комплементарную цепь РНК; Б - эта РНК служит затравкой для синтеза новой ДНК; В - РНК, входящая в состав новообразованной цепи, гидролизуется, при этом образуется брешь, которая впоследствии заполняется.

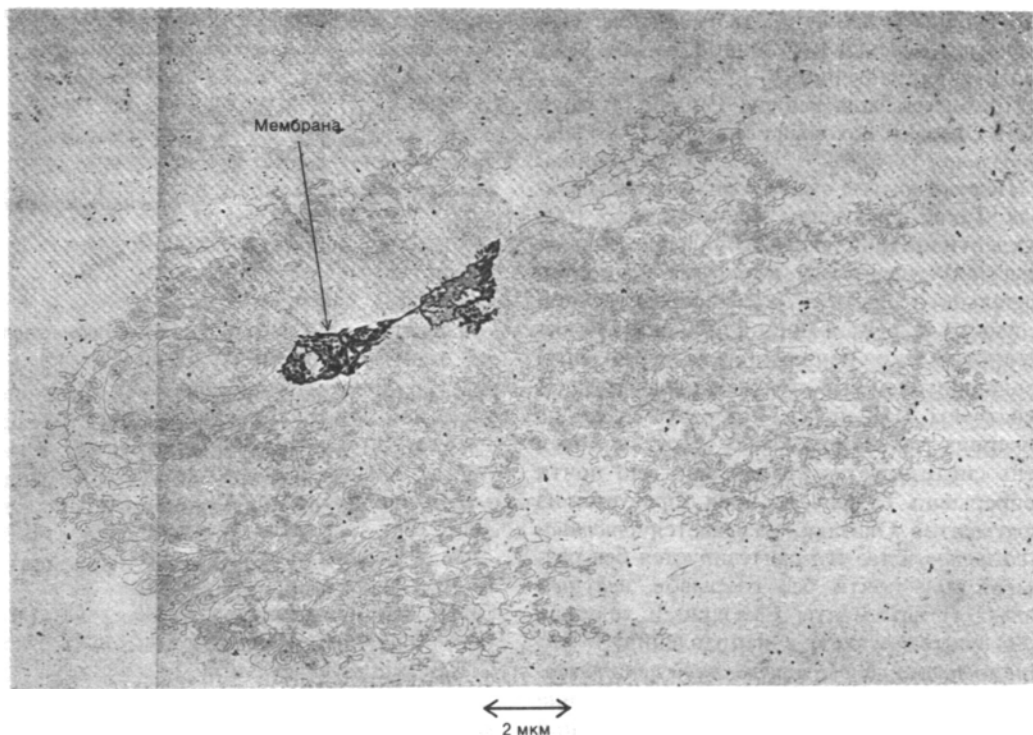


Рис. 24.42. Электронная микрофотография хромосомы *E. coli*, прикрепленной к двум фрагментам клеточной мембраны. На рисунке изображена одна интактная суперспирализованная молекула ДНК. [Delius H., Worcel A., J. Mol. Biol., 82, 108 (1974).]

на для синтеза ДНК на одноцепочечной матрице, заполняет эти брешы.

Последние исследования показали, что действию праймазы предшествует образование *предзатравочного промежуточного комплекса*, состоящего как минимум из пяти белков. Один из них - белок *dnaB* - может передвигаться вдоль ДНК, используя энергию гидролиза АТР. Белок *dnaB* может служить сигналом для активации праймазы. Специфичность инициации очередного цикла репликации может обеспечиваться белками, доставляющими белок *dnaB* точно в область гена *ilv*, где находится точка начала репликации хромосомы *E. coli*. Время начала репликации ДНК имеет критическое значение, поскольку оно должно быть скоординировано с делением клетки. И действительно, бактериальная хромосома ассоциирована с впячиванием клеточной мембраны (рис. 24.42).

ждается в затравке для синтеза полинуклеотида.

2. 3'-гидроксильная группа концевой рибонуклеотида этой цепи РНК служит затравкой для синтеза ДНК под действием голофермента ДНК-полимеразы III. Большая часть новообразованной ДНК синтезируется этим мультисубъединичным комплексом.

3. РНК-компонент этого РНК-ДНК-гибрида гидролизует под действием ДНК-полимеразы I.

4. После удаления РНК из новообразованных цепей между фрагментами ДНК остаются довольно обширные брешы. ДНК-полимераза I, которая хорошо приспособле-

24.21. Энергия гидролиза АТР используется для расплетания родительской ДНК в области репликационной вилки под действием белка гер

В 1953 г. Уотсон и Крик отмечали, что «раскрутить спираль - задача труднопреодолимая». Исследования, проведенные в последнее время, показали, что в клетке *E. coli*



Рис. 24.43. Каталитические активности ДНК-гиразы.

в области репликационной вилки происходит активное расплетание родительской двойной спирали под действием фермента — белка гер. Поскольку энергия для расплетания родительской ДНК высвобождается при гидролизе АТР, белок гер называют *хеликазой*. На разделение каждой пары оснований затрачиваются примерно две молекулы АТР. Затем каждая из разделенных цепей родительской ДНК взаимодействует с несколькими молекулами белка, связывающегося с одноцепочечной ДНК (ОЦ-связывающий белок). Роль ОЦ-связывающего белка — стабилизировать одноцепочечные участки ДНК, образовавшиеся под действием хеликазы, чтобы расплетенная область могла функционировать в качестве матрицы. ОЦ-связывающие белки назы-

вают также белками, дестабилизирующими спираль (белки ДС), или плавающими белками.

24.22. ДНК-гираза вводит отрицательные супервитки в родительскую ДНК, чтобы облегчить ее расплетание

При расплетании ковалентно замкнутой кольцевой молекулы ДНК возникают топологические проблемы, так как расплетание двойной спирали вызывает образование положительных супервитков в замкнутой молекуле. В области репликационной вилки родительская ДНК вращается со скоростью 100 об/с — более чем в 100 раз быстрее, чем обычная долгоиграющая пластинка. Чтобы процесс расплетания продолжался, необходимо снять эти положительные супервитки, образовавшиеся в результате вращения. Другими словами, необходимо наличие какого-то молекулярного шарнира. Недавно Мартин Геллерт (Martin Gellert) установил, что эту функцию выполняет *ДНК-гираза*. Эта топоизомераза удаляет положительные супервитки, внося одноцепочечные разрывы и затем заделывая фосфодиэфирные связи в остове ДНК. АТР не требуется для такой термодинамически выгодной релаксации третичной структуры ДНК. Более того, *ДНК-гираза* может активно вводить отрицательные супервитки в ковалентно замкнутую кольцевую ДНК за счет энергии гидролиза АТР (рис. 24.43). Эти отрицательные супервитки способствуют расхождению цепей родительской ДНК в области репликационной вилки¹.

24.23. Сложность аппарата репликации, по-видимому, необходима для обеспечения очень высокой надежности

Существующие представления о молекулярном механизме репликации ДНК у *E.coli*

¹ В этой главе автор называет ДНК-гиразой два совершенно различных фермента. Один из них — ДНК-гираза, способная вводить в ДНК термодинамически невыгодные отрицательные супервитки за счет энергии гидролиза АТР; другой — независимая от АТР ДНК-топоизомераза, приводящая кольцевую молекулу ДНК в термодинамически равновесное (релаксированное) состояние. Это два совершенно различных белка: у них различные ингибиторы, потребности в ионных условиях среды, механизм действия. В репликации в качестве молекулярного шарнира участвует ДНК-гираза. — Прим. перев.

24. ДНК: генетическая роль, структура к репликация

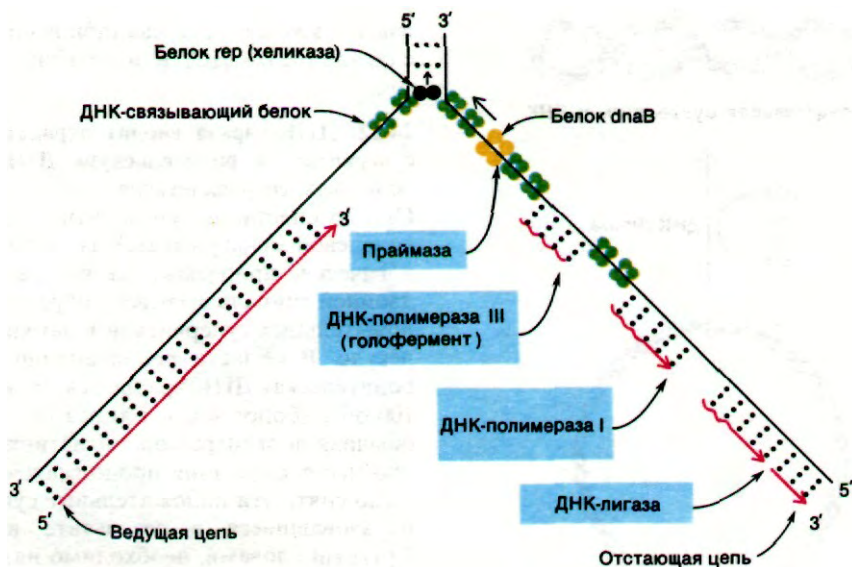


Рис. 24.44. Схематическое изображение ферментативных процессов в области репликационной вилки *E. coli*. Фрагменты, отмеченные синим цветом, катализируют инициацию, элонгацию и сшивание (с помощью ДНК-лигазы) цепей ДНК. (Kornberg A., DNA replication, W.H. Freeman and Co., 1980.)

предыдущую пару оснований. Частота ошибок для них на несколько порядков величины выше, чем для ДНК-полимераз. Было найдено остроумное решение этой проблемы: *начинать синтез ДНК с полинуклеотида, синтезируемого с низкой надежностью, но отмечать его «временный» характер, включив в его состав рибонуклео-*

Таблица 24.2. Белки репликации *E. coli*

Белок	Функция	Масса, кДа	Число молекул в клетке
dna B	Дает возможность праймазе иницировать синтез РНК	~250	20
Праймаза	Синтезирует РНК-затравки	60	100
гер	Расплетает двойную спираль	65	50
ДНК-связывающий	Стабилизирует одноцепочечные участки	74	300
ДНК-гираза	Вводит суперспиральные витки	400	
Голофермент ДНК-полимеразы III	Синтезирует ДНК	>300	20
ДНК-полимераза I	Удаляет затравку и заполняет бреши	109	300
ДНК-лигаза	Соединяет концы ДНК	74	300

тиды. Затем ДНК-полимераза I вырезает эти короткие последовательности РНК-затравок и замещает их последовательностью ДНК, синтезированной с высокой надежностью. Создается впечатление, что многие детали, усложняющие механизм репликации ДНК, предназначены для обеспечения чрезвычайно высокой точности. Генетический анализ показывает, что частота ошибок составляет одну на 10^7 - 10^{10} считанных пар оснований.

24.24. Повреждения ДНК постоянно репарируются

Поскольку множество химических и физических агентов вызывает в ДНК повреждения, во всех клетках имеются специальные механизмы для исправления этих повреждений. Основания в ДНК могут изменяться и теряться, фосфодиэфирные связи остова могут разрываться, а две цепи могут поперечно сшиваться друг с другом. Эти повреждения образуются под действием ионизирующей радиации, ультрафиолетового облучения и различных химических веществ. Многие повреждения в ДНК поддаются исправлению, так как генетическая информация записана в обеих цепях двойной спирали. Благодаря этому информацию, утраченную одной из цепей, можно извлечь из другой цепи.

Один из наиболее хорошо изученных механизмов репарации - вырезание *пиримидинового димера* (рис. 24.45), который образуется при действии на ДНК ультрафиолетового света. Соседние пиримидиновые остатки в одной цепи ДНК могут в этих условиях образовать ковалентную сшивку. Такой пиримидиновый димер не укладывается в двойную спираль, так что репликация и экспрессия генов оказываются блокированными до тех пор, пока повреждение не будет удалено.

В осуществлении этого процесса важную роль играют четыре ферментативные активности (рис. 24.46). Первая из них - *УФ-специфичная эндонуклеаза* - находит место повре-

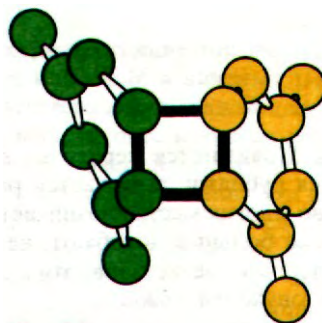
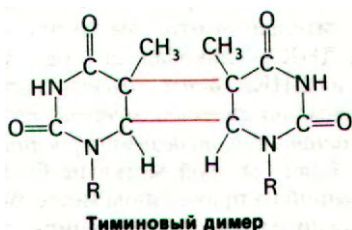


Рис. 24.45. Модель димера урацила, образованного под действием ультрафиолетового облучения. Тиминный димер имеет примерно такую же структуру.

ждения и вносит одноцепочечный разрыв вблизи от димера, обычно с 5'-стороны. Участок, содержащий димер, выпячивается из двойной спирали, что позволяет *ДНК-полимеразе I* (или другой подобной полимеразе) провести репарационный синтез в направлении 5'→3'. Затравкой при этом служит 3'-конец разорванной цепи, а матрицей - интактная комплементарная цепь. Затем область, где расположен пиримидиновый димер, вырезается под действием 5'→3'-*нуклеазной* активности ДНК-полимеразы. Наконец, новосинтезированная цепь и остаток той же цепи ДНК соединяются *ДНК-лигазой*. Другой путь репарации - фотохимическое расщепление пиримидинового димера. Почти все клетки содержат *фотореактивирующий фермент*, который узнает димер и расщепляет его на исходные основания, используя энергию поглощенного синего света.

24.25. Рак кожи при золотистой ксеродерме обусловлен нарушением нормальной репарации ДНК

Золотистая ксеродерма (Xeroderma pigmentosum) - редкое заболевание кожи у людей. Оно наследуется как аутосомный рецессивный признак. У гомозиготных больных кожа крайне чувствительна к солнечному и ультрафиолетовому свету. Серьезные поражения кожи наблюдаются уже в детстве, а с возрастом они принимают все более тяжелый характер. Кожа становится сухой, и дерма в значительной степени атро-



24. ДНК: генетическая роль, структура и репликация

от греч. слов, означающих «сухая кожа». Этот термин был впервые использован F. Hebra и M. Kaposi в 1874 г. для описания «пергаментной кожи» и аномальной пигментации, наблюдавшихся у одного из больных.

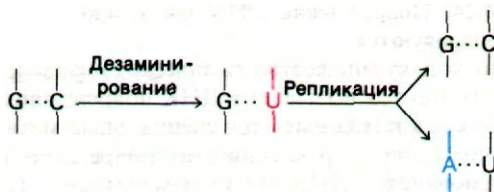
фируется. Появляются кератозы, веки покрываются рубцами, поражается рогавица. Обычно во многих местах возникает рак кожи. Многие больные погибают, не достигнув 30 лет, от метастазов этих злокачественных опухолей кожи.

В ДНК человека, как и у *E.coli*, под действием ультрафиолетового света образуются пиримидиновые димеры. Более того, механизмы репарации у человека и у *E.coli*, по-видимому, сходны. Изучение фибробластов кожи больных золотистой ксеродермой показало, что одна из форм этой болезни сопровождается биохимическим нарушением. В нормальных фибробластах половина пиримидиновых димеров, образовавшихся под действием ультрафиолетового облучения, вырезается менее чем за сутки. В фибробластах же, полученных от больных золотистой ксеродермой, за тот же промежуток времени вырезания димеров почти не наблюдается. Какой этап репарации нарушен? Ответ был получен путем определения молекулярной массы цепей ДНК из фибробластов, облученных ультрафиолетовым светом. В нормальных клетках в течение нескольких часов после облучения происходит заметное снижение молекулярной массы одноцепочечной ДНК. Это снижение молекулярной массы обусловлено первой реакцией процесса репарации, а именно расщеплением цепи ДНК рядом с пиримидиновым димером. После УФ-облучения клеток золотистой ксеродермы, наоборот, снижения молекулярной массы не происходит. Следовательно, *это кожное заболевание, возможно, вызвано инактивацией эндонуклеазы, которая гидролизует остов ДНК рядом с пиримидиновым димером. Тяжелые клинические последствия этого ферментативного нарушения свидетельствуют об исключительной важности процессов репарации ДНК.*

24.26. ДНК содержит тимин вместо урацила, что делает возможной репарацию дезаминированного цитозина

Цитозин в ДНК спонтанно дезаминируется с измеримой скоростью, образуя урацил.

Дезаминирование цитозина является потенциально мутагенным, так как образующийся урацил спаривается с аденином, и, следовательно, одна из дочерних цепей будет содержать AU-пару оснований вместо исходной GC-пары:



Эта мутация исправляется под действием репарационной системы, узнающей чужеродный урацил в молекуле ДНК (рис. 24.47). Прежде всего *урацил-ДНК-гликозидаза* гидролизует гликозидную связь остатка урацила с дезоксирибозой. На этом этапе остов ДНК остается интактным, но одно основание отсутствует. Затем специфическая эндонуклеаза узнает этот дефект и расщепляет остов рядом с отсутствующим основанием. ДНК-полимераза I вырезает оставшийся дезоксирибозофосфат и вставляет цитозин, комплементарный гуанину в неповрежденной цепи. Наконец, репарированная цепь заделывается ДНК-лигазой.

В течение многих лет оставалось загадкой, почему в ДНК присутствует тимин, а не урацил, ведь оба основания спариваются с аденином. Единственное различие между ними - метильная группа тимина на месте атома водорода при C-5 в урациле. Почему это метилированное основание используется в ДНК, но не в РНК? Напомним, что на метилирование дезокситимидилата с образованием дезокситимидилата расходуется много энергии (разд. 22.16). Открытие сравнительно недавно активной системы, репарирующей дезаминирование цитозина, служит убедительным ответом на эту загадку. Урацил-ДНК-гликозидаза не удаляет тимина из ДНК. Таким образом, метильная группа тимина служит меткой, позволяющей отличать его от дезаминированного цитозина. Если бы этой метки не было, урацил, стоящий на правильном месте, было бы невозможно отличить от урацила, образо-

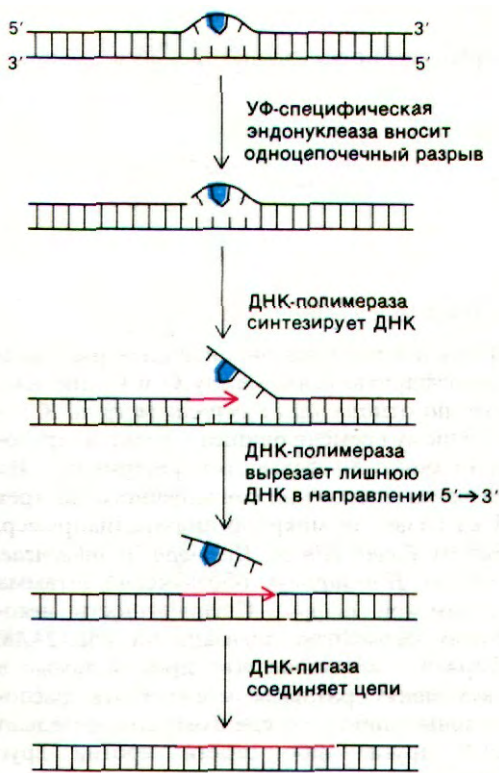


Рис. 24.46. Репарация участка ДНК, содержащего тиминный димер, в результате последовательного действия специфической эндонуклеазы, ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы. Тиминный димер показан синим цветом, а новосинтезированный участок ДНК - красным. [Hanawalt P.C, Endeavor, 31, 83 (1972).]

вавшегося в результате дезаминирования. Дефект остался бы незамеченным, и в одной из дочерних молекул ДНК неизбежно произошло бы мутационное замещение одной GC-пары на AU-пару. Система репарации, которая выискивает урацилы и оставляет тимины, подавляет такие мутации. По всей вероятности, *тимин используется в ДНК вместо урацила для увеличения надежности генетической информации*. В противоположность этому РНК не репарируется, и в ней используется урацил, так как он представляет собой менее дорогой строительный блок.

24.27. Рестриктирующие эндонуклеазы совершили переворот в анализе ДНК

Ферменты рестрикции - эндонуклеазы, способные узнавать определенные последовательности оснований в двухспиральной ДНК и расщеплять обе цепи. Эти исключительно тонкие скальпели - великолепный подарок природы биохимикам. Существование ферментов рестрикции позволило проводить эксперименты, о которых нельзя было даже и мечтать всего лишь несколько лет назад. Они представляют собой незаменимые инструменты для исследования

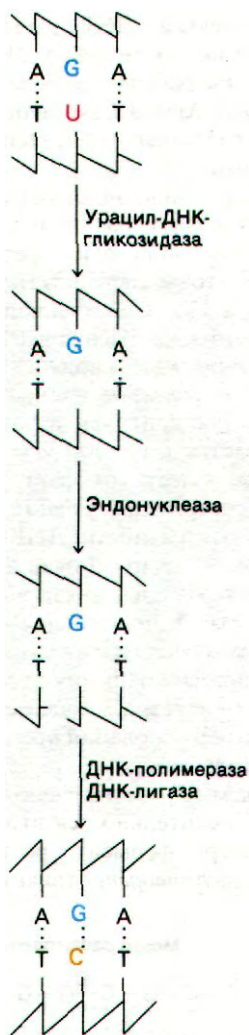


Рис. 24.47. Остатки уранила в ДНК вырезаются и замещаются цитозинном - исходным основанием.

24. ДНК: генетическая роль, структура и репликация

Палиндром (перевертыш) -

слово, предложение или стих, которые читаются одинаково слева направо и справа налево.

Примеры:

Радар

То не ясли ломал, а молился енол.

А роза упала на лапу Азора.

Нажал кабан на баклажан.

Roma tibi subito motibus ibit amor.

Происходит от греческого слова *palindromos* - бегу назад.

структуры хромосомы, определения последовательности нуклеотидов в очень длинных молекулах ДНК, выделения генов и получения новых молекул ДНК для клонирования. Разработку всех этих методов начали Вернер Арбер, Гамильтон Смит и Дэниел Натанс (Werner Arber, Hamilton Smith, Daniel Nathans).

Рестриктирующие эндонуклеазы обнаруживаются у самых различных прокариот. Биологическая роль этих ферментов состоит в том, чтобы расщеплять чужеродные молекулы ДНК. Собственная клеточная ДНК при этом не расщепляется, так как участки, узнаваемые своими ферментами рестрикции, у нее метилированы. Взаимосвязь между рестрикцией и модификацией рассматривается в гл. 30 (разд. 30.9). Важное значение имеет тот факт, что многие ферменты рестрикции узнают специфические последовательности ДНК длиной от четырех до шести пар оснований и гидролизуют фосфодиэфирные связи в обеих цепях в этой области. Удивительная особенность таких участков расщепления - их симметрия относительно оси вращения второго порядка. Другими словами, узнаваемая последовательность пар оснований представляет собой палиндром.

Расщепляемые участки расположены симметрично относительно оси второго порядка. Например, фермент рестрикции из *Streptomyces achromogenes* узнает последовательность



Часть IV.

Информация

В каждой цепи эта эндонуклеаза рвет фосфодиэфирную связь между G и C, дистальную по отношению к оси симметрии. К настоящему времени очищено и охарактеризовано более 80 ферментов рестрикции. Их названия состоят из сокращенного до трех букв названия микроорганизма (например, Eco от *E.coli*, Hin от *Haemophilus influenzae*, Hae от *H.aegyptins*), обозначения штамма и римской цифры. Специфичность некоторых ферментов показана на рис. 24.48. Обратите внимание, что производимые в двух цепях разрывы могут быть расположены либо со сдвигом относительно друг друга, либо строго против друг друга.

Ферменты рестрикции используются для расщепления молекул ДНК на определенные фрагменты, которые более удобны для анализа и манипулирования, чем исходная молекула. Например, EcoRI расщепляет кольцевую двухцепочечную ДНК вируса SV-40 длиной 5,1 kb только в одном месте, Hra - в четырех местах и Hind - в 11 местах. Кусок ДНК, образованный одним ферментом рестрикции, можно специфически расщепить на более мелкие фрагменты с помощью другого фермента. Используя несколько ферментов рестрикции, можно картировать хромосомы (разд. 31.8). Более того, набор фрагментов, полученных с помощью ферментов рестрикции, может служить своего рода «отпечатком пальца» для соответствующей молекулы ДНК. Небольшие различия между сходными молекулами ДНК можно легко выявить с помощью электрофоретического разделения их рестрикционных фрагментов. Для каждого данного геля электрофоретическая подвижность фрагмента ДНК обратно пропорциональна логарифму числа пар оснований (до определенного предела длины фрагментов). Для разделения фрагментов ДНК длиной до 1000 пар оснований используют полиакриламидный гель, а для

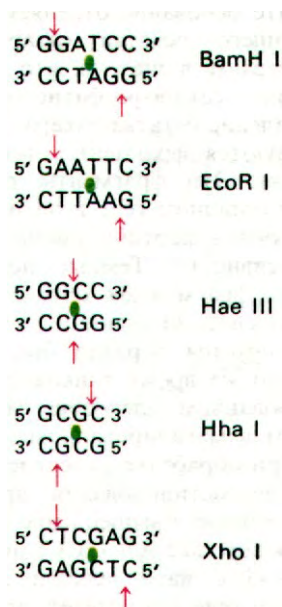


Рис. 24.48. Специфичность некоторых эндонуклеаз рестрикции. Последовательности пар оснований, узнаваемые этими ферментами, имеют ось симметрии второго порядка. Две цепи ДНК в этой области симметричны относительно оси, обозначенной зеленым овалом. (Одна цепь сдвинута относительно другой на 180°.) Места расщепления показаны красными стрелками. Сокращенные названия каждого фермента рестрикции приведены справа от последовательности, которую он узнает.

разделения более длинных молекул более пористый агарозный гель. Если ДНК содержит радиоактивную метку, полосы можно выявить методом радиоавтографии. В другом случае гель можно покрасить бромистым этидием, который при связывании с двухспиральной ДНК флуоресцирует ярким оранжевым светом. При использовании этого способа можно легко увидеть полосу, содержащую 50 нг ДНК (рис. 24.49). Помимо чувствительности, важное достоинство таких гелей - их высокая разрешающая способность.

24.28. Последовательность нуклеотидов в ДНК можно быстро определить с помощью специфического химического расщепления

Появление надежных методов определения последовательности нуклеотидов в молекулы ДНК облегчило также изучение структуры ДНК и ее связи с экспрессией гена. *Метод химического расщепления*, разработанный Алланом Максамом и Уолтером Гилбертом (Allan Maxam, Walter Gilbert), основан на использовании ДНК, меченной ^{32}P по одному из концов одной из цепей. Для введения ^{32}P в 5'-гидроксильный конец обычно используют полинуклеотидкиназу. Меченую ДНК расщепляют предпочтительно по одному из четырех нуклеотидов. Условия реакции подбирают таким образом, чтобы на каждую цепь приходился в среднем один разрыв.

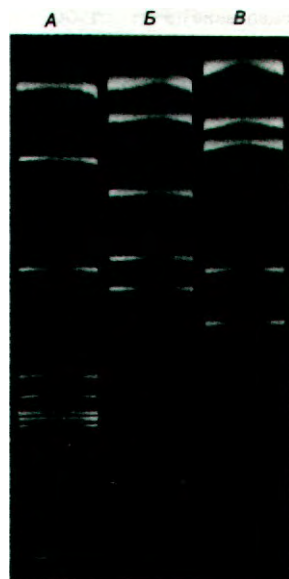


Рис. 24.49. Электрофоретическое разделение фрагментов, образующихся при расщеплении ДНК SV-40 тремя различными ферментами рестрикции. Эти фрагменты флуоресцируют благодаря тому, что гель окрашен бромистым этидием. (Печатается с любезного разрешения д-ра Jeffrey Sklar.)

24. ДНК: генетическая роль, структура и репликация

Частичное расщепление по каждому основанию дает набор радиоактивных фрагментов, начинающихся ^{32}P -меткой и кончающихся одним из положений этого основания. Например, если исследуемая ДНК имеет последовательность



то в результате специфического расщепления с 5'-стороны каждого из четырех оснований получатся следующие радиоактивные фрагменты:

Расщепление по А: $^{32}\text{P-GCT}$
 $^{32}\text{P-GCTACGT}$
 Расщепление по G: $^{32}\text{P-GCTAC}$
 Расщепление по C: $^{32}\text{P-G}$
 $^{32}\text{P-GCTA}$
 Расщепление по T: $^{32}\text{P-GC}$
 $^{32}\text{P-GCTACG}$

Затем эти фрагменты разделяют методом электрофореза в полиакриламидном геле, который дает возможность разделять молекулы ДНК, различающиеся по длине всего лишь на один нуклеотид. Следующий этап - радиоавтография этого геля. Как показано на рис. 24.50, самая нижняя полоса расположена на дорожке, соответствующей расщеплению по С, следующая - на дорожке Т, затем еще одна - на дорожке А. Следовательно, последовательность первых трех нуклеотидов имеет вид 5'-СТА-3'. Если прочитать все семь полос снизу вверх, получится последовательность 5'-СТАСГТА-3'. Итак, радиоавтограф геля, полученного после четырех различных реакций химического расщепления, дает набор полос, по которым можно непосредственно прочитать нужную последовательность.

Как достигается специфическое расщепление ДНК? Для этого используют соединения, которые способны модифицировать основание и затем отщеплять его от остатка сахара (рис. 24.51). Пурины модифицируют диметилсульфатом, метилирующим гуанин по N-7 и аденин по N-3. Расщепление гликозидной связи метилированного пурина легко достигается нагреванием при нейтральном значении pH.

В результате основание отделяется от соответствующего остатка сахара. Затем смесь нагревают в щелочи, что вызывает расщепление сахарофосфатного остова ДНК и удаление остатка сахара. В результате образуются фрагменты, несущие на конце метку. Эти фрагменты разделяют в полиакриламидном геле и на радиоавтографе получают картину полосы различной интенсивности. Темные полосы соответствуют фрагментам, образовавшимся при расщеплении по гуанину, так как гуанин метилируется гораздо быстрее, чем аденин. В то же время гликозидная связь в метилированном аденозине менее стабильна, чем в метилированном гуанозине. Поэтому при обработке разбавленной кислотой после метилирования происходит предпочтительное выщепление аденина (получается дорожка А + G). Сравнение дорожки А + G с параллельной дорожкой G на том же геле показывает, происходит ли расщепление по А или по G (рис. 24.52). Расщепление по цитозину и тимину проводят гидразином. Остов затем расщепляют

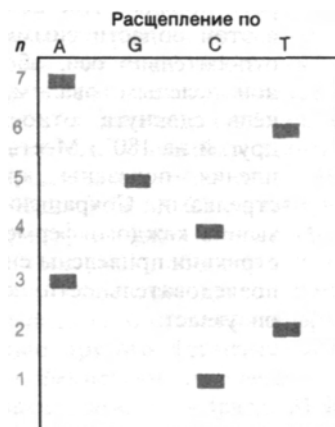


Рис. 24.50. Схематическое изображение геля, на котором показаны радиоактивные фрагменты, образовавшиеся при специфическом расщеплении последовательности 5'- $^{32}\text{P-GCTACGTA-3'}$ по каждому из четырех оснований (дорожки А, G, С и Т). Слева указано число нуклеотидов (n) в каждом фрагменте. Последовательность оснований читается непосредственно с геля снизу вверх.

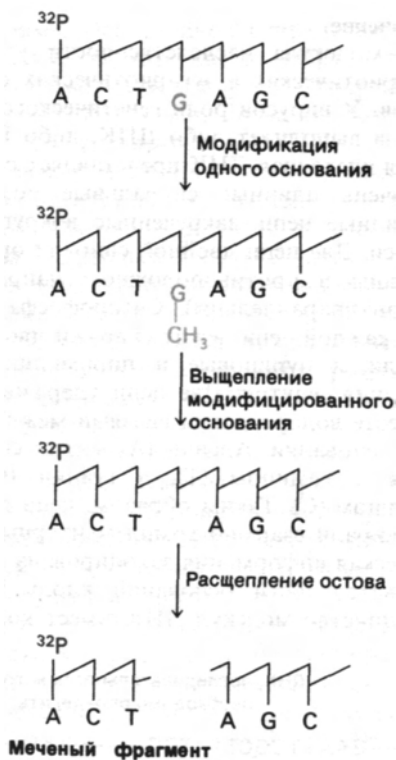


Рис. 24.51. Стратегия метода определения последовательности нуклеотидов в ДНК с помощью химического расщепления.

пиперидином, который вытесняет продукты реакции с гидразином и катализирует реакцию с гидразином и катализирует элиминацию фосфатов. В результате расщепления по цитозинам и тиминам получают серию полос примерно равной интенсивности (дорожка C + T). Эти пиримидины различают, проводя гидразинолиз в присутствии 2 М NaCl, подавляющим реакцию с тиминам (дорожка C). Теперь последовательность ДНК можно прочитать по радиоавтографу геля, сопоставляя дорожки G, A + G, C + T и C (рис. 24.52). Самый короткий фрагмент имеет самую высокую электрофоретическую подвижность, так что 5'-концу соответствует низ геля. Если использовать несколько различных гелей для разделений всех меченых фрагментов, можно легко определить таким образом последовательности длиной более 150 пар оснований.

24.29. Полная последовательность оснований ДНК фага φX174 была определена с помощью метода ферментативной репликации

Другой метод определения последовательности оснований в ДНК основан на образовании меченых фрагментов с помощью контролируемого прерывания ферментативной репликации *in vitro*. Этот метод разработали Фред Сэнгер (Fred Sanger) и его сотрудники. Для считывания определенной последовательности с одноцепочечной ДНК используют ДНК-полимеразу

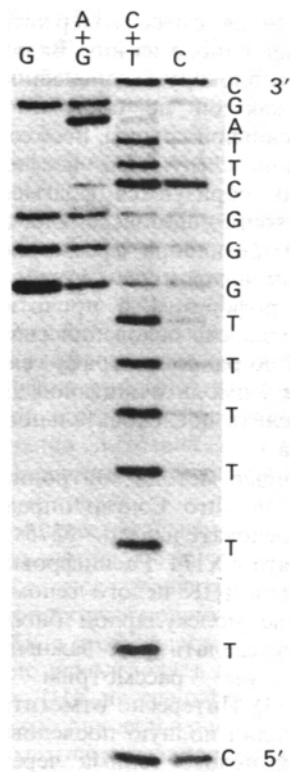


Рис. 24.52. На радиоавтографе геля видны меченые фрагменты, образовавшиеся при химическом расщеплении. 5'-конец этой ДНК был помечен ^{32}P . Самый короткий нуклеотид расположен у основания геля. С геля можно прочесть последовательность 5'-СТПТТТТГГГГСТТАГС-3'.

24. ДНК: генетическая роль, структура и репликация



I¹⁾. В качестве затравки для синтеза используется комплементарный фрагмент, который можно получить из набора продуктов рестрикции, соответствующей двухцепочечной ДНК. Кроме четырех радиоактивных дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, инкубационная смесь содержит 2',3'-дидезоксианалог одного из них. Включение этого аналога блокирует дальнейший рост цепи, так как он не содержит концевой 3'-гидроксильной группы, необходимой для образования следующей фосфодиэфирной связи. Так образуются фрагменты, несущие на 3'-конце дидезоксианалог (рис. 24.53). Затем четыре набора фрагментов, образованных терминированием цепей, разделяют гель-электрофорезом и прочитывают последовательность оснований синтезированной ДНК по радиоавтографу геля. Используя менее 1 пмоль очищенной ДНК, можно определить последовательности 200 нуклеотидов.

С помощью метода контролируемой репликации *in vitro* Сэнгер определил полную последовательность 5375 оснований в ДНК фага ФХ174. Расшифровка последовательности ДНК целого генома - крупное достижение молекулярной биологии. Она позволила сделать ряд важных выводов, которые мы рассмотрим в гл. 26 (разд. 26.11). Интересно отметить, что Сэнгер определил полную последовательность оснований целого генома через четверть века после того, как он расшифровал аминокислотную последовательность белка².

¹ Поэтому данный метод в отечественной литературе называют методом полимеразного копирования. - Прим. перев.

² Следует отметить, что в промежутке между этими открытиями Ф. Сэнгер разработал оригинальный метод определения последовательности оснований в РНК, который имел огромные преимущества перед другими известными в то время методами. - Прим. перев.

Заключение

ДНК - молекула наследственности у всех прокариотических и эукариотических организмов. У вирусов роль генетического материала выполняет либо ДНК, либо РНК. Любая клеточная ДНК представляет собой две очень длинные спиральные полинуклеотидные цепи, закрученные вокруг общей оси. Две цепи двойной спирали ориентированы в противоположном направлении (антипараллельны). Сахарофосфатный остов каждой цепи лежит снаружи двойной спирали, а пуриновые и пиримидиновые основания - внутри. Две цепи удерживаются вместе водородными связями между парами оснований. Аденин (А) всегда спаривается с тимин (Т), а гуанин (Г) - с цитозином (С). Таким образом, цепи двойной спирали взаимно комплементарны. Генетическая информация закодирована в последовательности оснований вдоль цепи. Большинство молекул ДНК имеет кольце-

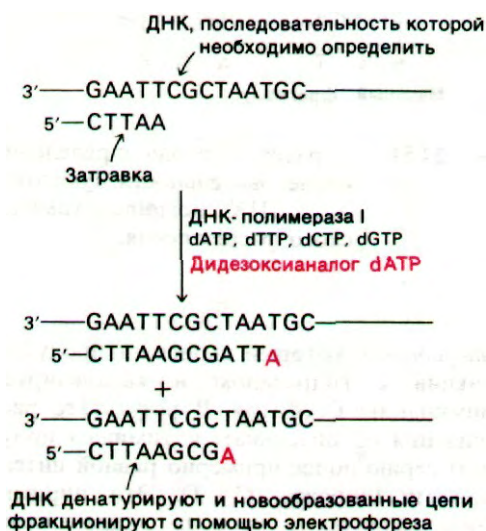


Рис. 24.53. Стратегия метода определения последовательности нуклеотидов в ДНК путем терминирования цепи. Фрагменты образуются в результате добавления 2',3'-дидезоксианалога одного из dNTP в каждую из четырех пробирок, в которых происходит полимеризация. Например, при добавлении дидезоксианалога dATP образуются фрагменты, оканчивающиеся на А (показано красным цветом).

вую форму. Ось двойной спирали кольцевой ДНК может сама закручиваться и образовывать суперспираль. Суперспирализованная ДНК имеет более компактную форму, чем релаксированная ДНК.

При репликации ДНК две цепи двойной спирали расплетаются и расходятся по мере того, как синтезируются новые цепи. Каждая родительская цепь служит матрицей для образования новой комплементарной цепи. Таким образом, репликация ДНК полуконсервативна — каждая дочерняя молекула получает одну цепь родительской молекулы ДНК. Репликация ДНК — сложный процесс, в осуществлении которого участвует много белков, в том числе ДНК-полимеразы трех типов и ДНК-лигаза. Активированные предшественники синтеза ДНК — четыре дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты. Новая цепь синтезируется в направлении $5' \rightarrow 3'$. Этот синтез осуществляется путем нуклеофильной атаки внутреннего атома фосфора очередного дезоксинуклеозидтрифосфата 3'-гидроксильным концом цепи затравки. Самое важное состоит в том, что ДНК-полимераза катализирует образование фосфодиэфирной связи только в том случае, если основание очередного нуклеотида комплементарно основанию матричной цепи. Другими словами, ДНК-полимеразы — ферменты, направляемые матрицами. ДНК-полимеразы I, II и III обладают также $3' \rightarrow 5'$ -экзонуклеазной активностью, которая увеличивает надежность репликации путем удаления некомплементарных остатков. ДНК-полимеразам I и III присуща, кроме того, $5' \rightarrow 3'$ -нуклеазная активность, играющая важную роль в механизмах репликации и репарации ДНК.

Репликация ДНК в клетках *E.coli* начинается в строго определенном месте (в точке начала репликации) и идет в обоих направлениях. В области репликационной вилки (там, где из двух цепей ДНК получаются четыре) обе цепи родительской ДНК используются в качестве матриц для синтеза новой ДНК. Белок *гер* расплетает родительскую ДНК за счет энергии гидро-

лиза АТФ. Расплетанию способствует также ДНК-гираза, которая играет роль молекулярного шарнира и вводит отрицательные супервитки в родительскую ДНК. Одна цепь ДНК (ведущая) синтезируется непрерывно, тогда как другая (отстающая) синтезируется в виде фрагментов длиной 1 kb. Поскольку образование отстающей цепи происходит путем сборки из отдельных фрагментов, полимеризация в направлении $5' \rightarrow 3'$ на атомном уровне приводит к общему росту этой цепи в направлении $3' \rightarrow 5'$. Синтезу новой ДНК предшествует синтез РНК, которая используется затем в качестве затравки. Впоследствии РНК, входящая в состав новообразованной РНК-ДНК-цепи, гидролизруется и замещается ДНК. Затем ДНК-лигаза соединяет новообразованные фрагменты ДНК, которые спарены с одной и той же матричной цепью. В этой реакции участвует в качестве источника энергии NAD^+ .

Повреждения в ДНК, вызванные ионизирующей радиацией, ультрафиолетовым светом и различными химическими соединениями, постоянно репарируются. Например, пиримидиновые димеры, индуцированные ультрафиолетовым светом, вырезаются специфической эндонуклеазой. Урацил, который образуется при спонтанном дезаминировании цитозина в ДНК, удаляется гликозидазой, которая дифференцирует урацил и тимин.

Ферменты рестрикции узнают специфические последовательности, обладающие симметрией второго порядка, и гидролизуют одну фосфодиэфирную связь в каждой цепи ДНК в этой области. Эти эндонуклеазы можно использовать для расщепления молекул ДНК на специфические фрагменты, удобные для дальнейшего изучения. Разработка методов, позволяющих быстро определять последовательность нуклеотидов в ДНК на основе специфического расщепления и электрофоретического разделения продуктов, революционизировала изучение структуры ДНК.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Kornberg A., 1979. Aspects of DNA replication, Cold Spring Harbor Symp., Quant Biol., 43, 1-9.

Alberts B., Sternglanz R., 1977. Recent excitement in the DNA replication problem, Nature, 269, 655-661.

Fiddes J.G., 1977. The nucleotide sequence of a viral DNA, Sci. Amer., 237(6), 54-67.

Hamilton H.O., 1979. Nucleotide sequence specificity of restriction endonucleases, Science, 205, 455-622.

Nathans D., 1979. Restriction endonucleases, simian virus 40, and the new genetics, Science, 206, 903-909.

Bauer W.R., Crick F.H.C., White J.H., 1980. Supercoiled DNA, Sci. Amer., 243(1), 118-133. (Ясно и четко рассмотрена топология суперспиральных ДНК.)

Книги

Kornberg A., 1980. DNA Replication, Freeman. (Выдающаяся монография, читается с большим интересом.)

Cold Spring Harbor Laboratory, 1979. Replication and Recombination, Cold Spring Harbor Symposia of Quantitative Biology, vol. 43. (Наиболее информативный сборник статей по репликации, репарации и рекомбинации ДНК.)

Bloomfield V.A., Crothers D.M., Tinoco I., Jr., 1974. Physical Chemistry of Nucleic Acids, Harper and Row. *Davidson J.N.*, 1977. The Biochemistry of the Nucleic Acids, Academic Press. *Ts'o P.O.P.*, 1974. Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry, vol. 1 and 2, Academic Press.

Возникновение основополагающих концепций

Avery O.T., MacLeod C.M., McCarty M., 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* Type III, J. Exp. Med., 79, 137-158.

Hershey A.D., Chase M., 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage, J. Gen. Physiol., 36, 39-56.

Watson J.D., Crick F.H.C., 1953.

Molecular structure of nucleic acid. A structure for deoxyribose nucleic acid, Nature, 171, 737-738.

Watson J.D., Crick F.H.C., 1953. Genetic implications of the structure of deoxyribonucleic acid, Nature, 171, 964-967.

Kornberg A., 1960. Biological synthesis of deoxyribonucleic acid, Science, 131, 1503-1508.

Meselson M., Stahl F.W., 1958. The replication of DNA in *Escherichia coli*, Proc. Nat. Acad. Sci., 44, 671-682.

Taylor J.H. (ed.), 1965. Selected Papers on Molecular Genetics, Academic Press. (В этой книге содержатся классические статьи, упоминавшиеся в данной главе.)

Определение последовательности оснований в ДНК

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, Proc. Nat. Acad. Sci., 74, 5463-5467.

Maxam A.M., Gilbert W., 1977. A new method for sequencing DNA, Proc. Nat. Acad. Sci., 74, 560-564.

Белки, участвующие в репликации ДНК

Wickner S.H., 1978. DNA replication proteins of *Escherichia coli*, Ann. Rev. Biochem., 47, 1163-1191.

Lehman I.R., 1974. DNA ligase: structure, mechanism, and function, Science, 186, 790-797.

McHenry C., Kornberg A., 1977. DNA polymerase III holoenzyme of *Escherichia coli*: purification and resolution into subunits, J. Biol. Chem., 252, 6478-6484.

Rowen L., Kornberg A., 1978. Primase, the dna G protein of *Escherichia coli*: an enzyme which starts DNA chains, J. Biol. Chem., 253, 758-764.

Kornberg A., Scott J.F., Bertsch L.L., 1978. ATP utilization by *rep* protein in the catalytic separation of DNA strands at a replicating fork, J. Biol. Chem., 253, 3298-3304.

Cozzarelli N.R., 1977. The mechanism of action of inhibitors of DNA synthesis, Ann. Rev. Biochem., 46, 641-668.

Место начала репликации ДНК и направление репликации

Prescott D.M., Kuempel P. L., 1972. Bidirectional replication of the chromosome in *E. coli*, Proc. Nat. Acad. Sci., 69, 2842-2845.

Bird R.E., Lourain J., Martuscelli J., Caro L., 1972. Origin and sequence of chromosome replication in *E. coli*, J. Mol. Biol., 70, 549-566.

Ogawa T., Okazaki T., 1980. Discontinuous DNA replication, Ann. Rev. Biochem., 49, 421-458.

Структура ДНК

Cantor C.R., Schimmel P.R., 1980. Biophysical Chemistry, Freeman. [Имеется перевод: Кантор Ч., Шimmel П. Биофизическая химия. В 3-х т. - М.: Мир, 1984.] (Гл. 3 и 6 в томе 1 и гл. 22-24 в томе 3 содержат превосходный обзор, посвященный конформации нуклеиновых кислот.)

Суперспиральная ДНК

Bauer W.R., 1978. Structure and reactions of closed duplex DNA, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 7, 287-313.

Crick F.H.C., 1976. Linking numbers and nucleosomes, Proc. Nat. Acad. Sci., 73, 2639-2643. (Доступное введение в проблему порядка зацепления, напряжения и угла закручивания суперспиральной ДНК.)

Mizuuchi K., O'Dea M.H., Gellert M., 1978. DNA gyrase: subunit structure and ATPase activity of the purified enzyme, Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 5960-5963.

Cozzarelli N.R., 1980. DNA gyrase and the supercoiling of DNA, Science, 207, 953-960.

Репарация ДНК

Hanawalt P.C., Cooper P.K., Ganesan A.K., Smith C.A., 1979. DNA repair in bacteria and mammalian cells, Ann. Rev. Biochem., 48, 783-836.

Lindahl T., Ljungquist S., Siebert W., Nyberg B., Sperens B., 1977. DNA N-glycosidases. Properties of uracil-DNA glycosidase from *Escherichia coli*, J. Biol. Chem., 252, 3286-3294.

Cleaver J.E., 1978. Xeroderma pigmentosum. In: Stanbury J.B., Wyngaarden J. B., Fredrickson D. S. (eds.), The Metabolic Basis of Inherited Disease (4th ed.), pp. 1072-1095, McGraw-Hill.

Воспоминания и исторические очерки

Cairns J., Stent G.S., Watson J. D. (eds.), 1966. Phage and the Origins of Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory. (Увлекательный сборник воспоминаний некоторых основоположников молекулярной биологии.) *Watson J.D.*, 1968. The Double Helix, Atheneum. (Живой рассказ об откры-

тии структуры ДНК и ее биологических функциях, в котором проступает яркая личность автора.) [Имеется перевод: Уотсон Д. Двойная спираль. - М.: Мир, 1969.]
Olby R., 1974. The Path to the Double

Helix, University of Washington Press.
Portugal F.H., Cohen J.S., 1977. A Century of DNA: A History of the Discovery of the Structure and Function

of the Genetic Substance, MIT Press.
Judson H., 1979. The Eighth Day of Creation, Simon and Schuster.

Вопросы и задачи

1. Напишите комплементарные последовательности (в стандартной записи в направлении 5'→3') для следующих последовательностей:

- а) GATCAA,
- б) TCGAAC,
- в) ACGCGT,
- г) TACCAT.

2. Одна из цепей двухспиральной ДНК имеет следующий нуклеотидный состав (относительное молярное содержание): [A] = 0,30, [G] = 0,24.

- а) Что можно сказать о содержании [T] и [C] в той же цепи?
- б) Что можно сказать о содержании [A], [G], [T] и [C] в комплементарной цепи?

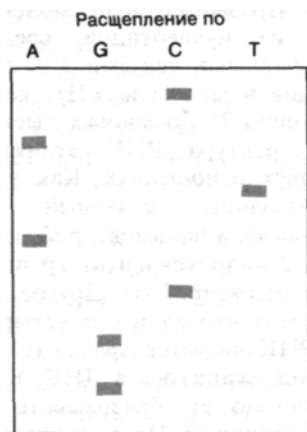


Рис. 24.54. Схематическое изображение радиоавтографа геля. Видны радиоактивные фрагменты, образующиеся при специфическом расщеплении олигонуклеотидов.

3. ДНК одного делеционного мутанта бактериофага λ имеет контурную длину 15 мкм вместо 17 мкм. Сколько пар оснований недостает у этого мутанта?

4. Какой результат получили бы Меселсон и Сталь, если бы репликация ДНК была консервативной? Укажите предполагаемое распределение молекул ДНК после 1-й и 2-й генераций в случае консервативной репликации (т.е. когда родительская двойная спираль не расходится).

5. Зависит ли от видовой принадлежности способность известных ДНК-лигаз использовать для соединения ДНК-цепей NAD^+ или АТФ? Предположим, что обнаружена новая ДНК-лигаза, нуждающаяся в каком-то другом источнике энергии. Предположите приемлемую с энергетической точки зрения замену NAD^+ или АТФ в этой реакции.

6. ДНК-лигаза из *E. coli* релаксирует суперспирализованную кольцевую ДНК в присутствии АМР. В отсутствие АТФ эта активность не проявляется. Каков механизм этой реакции и почему он зависит от АМР?

7. На рис. 24.54 приведена схема радиоавтографа геля с четырьмя дорожками фрагментов ДНК, образовавшихся при химическом расщеплении. ДНК содержала ^{32}P -метку на 5'-конце. Какова последовательность этой ДНК?

Дополнительные вопросы см.: Wood W. B., Wilson J. H., Benbow R. M., Hood L. E. Biochemistry: A Problems Approach, Benjamin, 1974, chs. 16, 17.

ГЛАВА 25

Информационная РНК и транскрипция

В этой главе мы рассмотрим выражение в фенотипе (экспрессию) генетической информации, содержащейся в ДНК. Функция генов - кодирование синтезируемых в клетке белков. Однако сама ДНК не используется в качестве непосредственной матрицы для синтеза белка. Роль таких матриц выполняют молекулы РНК (рибонуклеиновой кислоты). В норме поток генетической информации в клетке идет в следующем направлении:



В настоящей главе мы увидим, что *некоторые молекулы РНК играют роль промежуточных переносчиков информации в синтезе белка, тогда как другие молекулы РНК являются частью аппарата белкового синтеза*. Затем мы рассмотрим синтез РНК, протекающий в соответствии с последовательностью ДНК-матрицы. Это - процесс *транскрипции*, за которым следует трансляция. При *трансляции* РНК-матрицы направляют синтез белков. Более подробно этот вопрос рассматривается в гл. 27.

Участие РНК в синтезе белка казалось вероятным уже в 1940 г., за несколько лет до того, как было показано, что ДНК - материал наследственности. Торбьёрн Касперсон (Torbjörn Caspersson) изучал распределение РНК и ДНК в отдельных эукариотических клетках с помощью световой микроскопии. Он исходил из того факта, что и РНК, и ДНК сильно поглощают ультрафиолетовый свет с длиной волны 260 нм, но только ДНК интенсивно окра-

шивается реактивом Фельгена. Касперсон обнаружил, что почти вся ДНК содержится в ядре, тогда как РНК находится большей частью в цитоплазме. К такому же выводу пришел Жан Браше (Jean Brachet), который разделял клетки на ядерную и цитоплазматическую фракции и определял в них содержание ДНК и РНК. Более того, он обнаружил, что РНК в цитоплазматической фракции находится в составе маленьких частиц и ассоциирована с белком. Было показано, что эти частицы, состоящие из РНК и белка, служат местом синтеза белка. Теперь их называют *рибосомы*.

25.1. Структура РНК

РНК, подобно ДНК, представляет собой длинную неразветвленную молекулу, состоящую из нуклеотидов, соединенных фосфодиэфирными связями 3'—>5'. Число нуклеотидов в молекуле РНК колеблется от всего лишь 75 до многих тысяч. Ковалентная структура РНК отличается от ДНК в двух отношениях. Как указывает само название, сахарный остаток в РНК - *рибоза*, а не дезоксирибоза. Рибоза содержит 2'-гидроксильную группу, которой нет в дезоксирибозе. Другое различие состоит в том, что одним из четырех оснований в РНК является *урацил* (U) - вместо тимина, содержащегося в ДНК. Как и тимин, урацил может образовывать пару оснований с аденином. Но в молекуле урацила нет метильной группы, имеющейся в молекуле тимина.

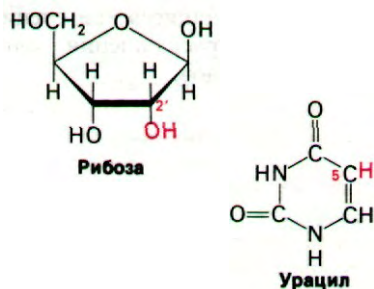


Таблица 25.1. Молекулы РНК у *E. coli*

Тип РНК	Отно- ситель- ное со- держа- ние, %	Коэф- фици- ент sedi- мента- ции, S	Масса, кДа	Число нукле- отидов
Рибосомная (рРНК)	80	23	$1,2 \cdot 10^3$	3700
		16	$0,55 \cdot 10^3$	1700
		5	$3,6 \cdot 10^1$	120
Транспортная (тРНК)	15	4	$2,5 \cdot 10^1$	75
Информаци- онная (мРНК)	5		Гетерогенна	

Молекулы РНК имеют одноцепочное строение, за исключением РНК некоторых вирусов. Поэтому нуклеотидный состав РНК не подчиняется правилу комплементарности. Действительно, в большинстве молекул РНК содержание аденина отличается от содержания урацила, а содержание гуанина отличается от содержания цитозина. Но молекулы РНК все-таки содержат участки с двухцепочечной структурой, которые образуют петли в виде шпильки (рис. 25.2). В этих участках А спаривается с U, а G спаривается с C. Кроме того, G может образовывать пару оснований с U, но она менее прочна, чем GC-пара (разд. 27.6). Спаривание оснований в шпильках РНК часто несовершенно. Некоторые основания, расположенные в шпильке друг против друга, не комплементарны, и одно или несколько оснований в одной из цепей могут выпетливаться (выступать) из участка двойной спирали, чтобы облегчить спаривание других оснований. Доля двухспиральных участков в различных РНК варьирует в широких пределах - в наиболее типичном случае до 50%

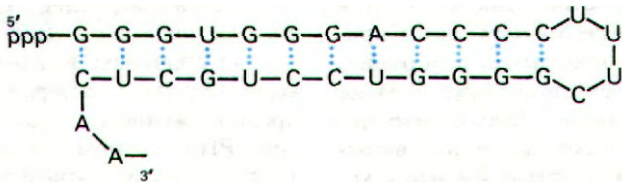


Рис. 25.2. РНК может складываться сама на себя и образовывать двухспиральные структуры.

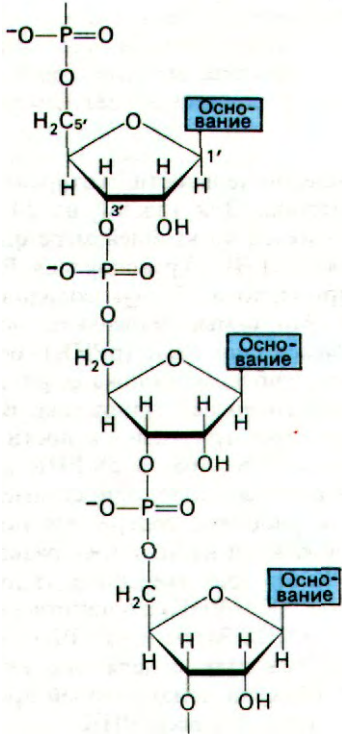


Рис. 25.1. Структура части цепи РНК.

25.2. Клетки содержат три типа РНК: рибосомную, транспортную и информационную
Клетки содержат три типа РНК (табл. 25.1). Информационная РНК (ее называют также матричная РНК, отсюда мРНК) служит матрицей для синтеза белка. Каждому работающему гену (или группе генов) соответствует своя молекула мРНК. Следовательно, мРНК -крайне гетерогенный класс молекул, у *E. coli* средняя длина молекулы мРНК составляет примерно 1,2 kb. Транспортная РНК (тРНК) переносит аминокислоты в активированной форме к рибосомам, где они соединяются пептидной связью в определен-

ной последовательности, которую задает РНК-матрица. Для каждой из 20 аминокислот имеется по крайней мере одна разновидность тРНК, Транспортная РНК состоит примерно из 75 нуклеотидов (масса 25 кДа). Это самые маленькие молекулы РНК. *Рибосомная РНК* (рРНК) - основной компонент рибосом, но пока ее роль в синтезе белка точно не установлена. В клетке *E. coli* имеется три разновидности рРНК, называемые 23S-, 16S- и 5S-РНК соответственно их поведению при седиментации. В каждой рибосоме содержится по одной молекуле каждой из этих трех разновидностей РНК. Из трех указанных типов РНК (мРНК, тРНК, рРНК) количественно преобладает рРНК. Затем идет тРНК, и меньше всего в клетке содержится информационной РНК, на долю которой приходится всего лишь 5% всей РНК.

25.3. Формулирование концепции информационной РНК

Концепция мРНК была сформулирована Франсуа Жакобом и Жаком Моно (Francois Jacob, Jacques Monod) в классической статье, опубликованной в 1961 г. Поскольку в эукариотических клетках белки синтезируются в цитоплазме, а не в ядре, было очевидно, что должен существовать какой-то химический посредник, кодируемый генами. Жакоб и Моно назвали его структурным посредником. Какова природа этого промежуточного продукта? Важную роль в решении этого вопроса сыграло проведенное ими исследование регуляции синтеза белка у *E. coli* (гл. 28). Некоторые ферменты *E. coli*, например ферменты, участвующие в поглощении и использовании лактозы, индуцибельны. Это означает, что количество этих ферментов увеличивается более чем в 1000 раз в присутствии индуктора (например, изопропил-тиогаляктозида). Особенно показательна была кинетика индукции. Добавление индуктора уже через несколько минут вызывало максимальный синтез ферментов, катализирующих обмен лактозы. При удале-

нии индуктора синтез данных ферментов прекращался также быстро. Эти экспериментальные данные были несовместимы с существованием стабильных матриц для синтеза указанных ферментов. Отсюда Жакоб и Моно сделали вывод, что *время жизни посредника должно быть очень коротким*. Затем они предположили, что он должен обладать следующими свойствами.

1. Посредник должен быть полинуклеотидом.

2. Нуклеотидный состав предшественника должен соответствовать нуклеотидному составу ДНК, которая его кодирует.

3. Посредник должен быть весьма гетерогенным по размеру, так как гены (или группы генов) различаются по длине. Жакоб и Моно высказали правильное предположение, что три нуклеотида кодируют одну аминокислоту, и вычислили, что масса посредника должна быть не менее 500 кДа.

4. Посредник должен быть временно ассоциирован с рибосомами - местом синтеза белка.

5. Посредник должен синтезироваться и распадаться очень быстро. Отсюда следует, что аналоги оснований, например 5-фторурацил, должны включаться в посредник в течение нескольких минут.

Для Жакоба и Моно было очевидно, что известные в то время фракции РНК не удовлетворяют этим критериям. Рибосомная РНК, которую принято было считать матрицей для синтеза белков, была слишком гомогенна по размеру. Кроме того, ее нуклеотидный состав был сходен у видов, сильно различавшихся по нуклеотидному составу ДНК. Более того, эта РНК была стабильной, и 5-фторурацил включался в нее очень медленно. Транспортная РНК тоже не подходила на роль посредника по тем же причинам. К тому же она слишком мала. Однако в литературе высказывалось предположение о существовании третьего типа РНК, который, по-видимому, удовлетворял всем критериям посредника. В клетках *E. coli*, зараженных бактериофагом Т2 (рис. 25.3), была обнаружена ранее неизвестная фракция РНК подходящего размера с очень коротким временем жиз-

ни. Самое интересное, что нуклеотидный состав этой фракции РНК был близок к составу вирусной ДНК, а не ДНК *E. coli*.

25.4. Экспериментальные данные о существовании информационной РНК-посредника в синтезе белка

Правомочность гипотезы о короткоживущей РНК-посреднике, играющей роль переносчика информации при синтезе белка, была проверена вскоре после того, как гипотеза была сформулирована. Сидней Бреннер, Франсуа Жакоб и Мэтью Меселсон (Sydney Brenner, Francois Jacob, Matthew Meselson) провели эксперименты на *E. coli*, зараженной бактериофагом Т2. Почти все белки, синтезирующиеся после заражения, детерминируются генами фага. Синтез этих белков не сопровождается увеличением общего количества РНК. Однако вскоре после заражения появляется минорная фракция РНК с коротким временем жизни. Как уже говорилось выше, нуклеотидный состав минорной фракции РНК сходен с составом фаговой ДНК. Эта система представлялась оптимальной для проверки гипотезы посредника, поскольку в ней происходило быстрое переключение природы синтезируемого белка. Еще одно преимущество состояло в том, что в зараженных клетках не происходило синтеза рРНК и тРНК.

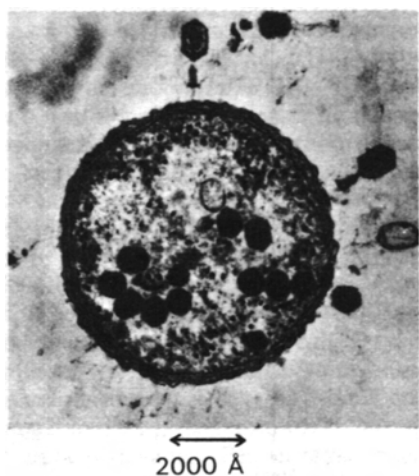


Рис. 25.3. Электронная микрофотография клетки *E. coli*, зараженной вирусами Т2. (Печатается с любезного разрешения д-ра Lee Simon.)

Как же происходит при заражении переключение синтеза с одних белков на другие? Одна возможность состояла в том, что фаговая ДНК программирует образование новых рибосом. Согласно этому предположению, гены определяют синтез специализированных рибосом, а каждая рибосома может синтезировать белок только одного вида. Альтернативное предположение, выдвинутое Жакобом и Моно, состояло в том, что рибосомы - неспециализированные структуры, которые получают генетическую информацию от гена в виде нестабильной информационной РНК (посредника). Эксперименты Бреннера, Жакоба и Меселсона были спланированы таким образом, чтобы можно было выяснить, происходит ли после заражения синтез новых рибосом или же новообразованная РНК присоединяется к предсуществовавшим рибосомам.

Бактерии выращивали в среде, содержащей тяжелые изотопы (^{15}N и ^{13}C), заражали фагом и немедленно переносили в среду, содержащую легкие изотопы (^{14}N и ^{12}C). Рибосомы, синтезированные до и после заражения, можно было разделить центрифугированием в градиенте плотности, так как их плотности различались («тяжелые» и «легкие» соответственно; рис. 25.4). Новая РНК была помечена радиоактивными изотопами с помощью ^{32}P - и ^{14}C -урацила, а новый белок был помечен изотопом ^{35}S . В результате этих экспериментов было установлено следующее.

1. Синтеза рибосом после заражения не происходит, о чем свидетельствует отсутствие «легких» рибосом.

2. РНК синтезируется после заражения. Большая часть радиоактивно меченной РНК обнаруживается в «тяжелом» рибосомном пике. Итак, большая часть ново-синтезированной РНК ассоциирована с предсуществующими рибосомами. Дополнительные эксперименты показали, что во время роста фага происходит быстрый распад и ресинтез этой новой РНК.

3. Радиоактивный изотоп ^{35}S временно появлялся в «тяжелом» рибосомном пике, из чего следует, что синтез новых белков происходит на предсуществующих рибосомах.

Эти эксперименты позволили сделать



Рис. 25.4. Центрифугирование рибосом и РНК контрольных бактерий и бактерий, зараженных фагом Т2, в градиенте плотности. Меченная ^{32}P РНК, синтезированная после заражения, попадает в полосу рибосом, образованных до заражения («тяжелые» рибосомы). После заражения синтеза рибосом не происходит.

следующий вывод: *рибосомы - неспециализированные структуры, синтезирующие в каждый данный момент тот белок, который закодирован в информационной РНК, находящейся в данный момент в рибосомах.* Исследования незараженных бактериальных клеток также показали, что информационная РНК служит звеном, переносящим информацию от гена к белку. Вскоре представление об информационной РНК стало одним из основополагающих в молекулярной биологии.

25.5. Опыты по гибридизации показали, что информационная РНК комплементарна кодирующей ее ДНК-матрице

В 1961 г. Сол Спигелман (Sol Spiegelman) разработал новый метод, названный *гибридизацией*. Он должен был дать ответ на следующий вопрос: комплементарна ли последовательность оснований РНК, синтезированной после заражения фагом Т2, последовательности оснований ДНК фага Т2? Из работы Джулиуса Мармура и Пола Доти (Julius Marmur, Paul Doty) было известно, что при нагревании двухспираль-

ной ДНК выше температуры плавления она переходит в одноцепочечную форму. При медленном охлаждении раствора эти цепи реассоциируют и образуют двухспиральную структуру, обладающую биологической активностью. Мармур и Доти обнаружили также, что двухспиральные молекулы образуются только в том случае, если цепи ДНК происходят из организмов одного вида или близкородственных видов. Это наблюдение подсказало Спигелману, что в смеси одноцепочечной ДНК и РНК должны образовываться гибриды ДНК-РНК, если их последовательности оснований комплементарны (рис. 25.5). Схема эксперимента была следующей:

1. РНК, синтезированную после заражения *E. coli* фагом Т2 (Т2-мРНК), метили изотопом ^{32}P . В другом эксперименте ДНК фага Т2 (Т2-ДНК) поместили изотопом ^3H .

2. Смесь Т2-мРНК и Т2-ДНК нагревали до 100°C . В результате двухспиральная ДНК расплавлялась и переходила в одноцепочечную форму. Этот раствор, содержащий одноцепочечные РНК и ДНК, медленно охлаждали до комнатной температуры.

3. Охлажденную смесь анализировали методом центрифугирования в градиенте плотности. Образцы центрифугировали несколько дней в бакет-ротаторе. Затем пласти-

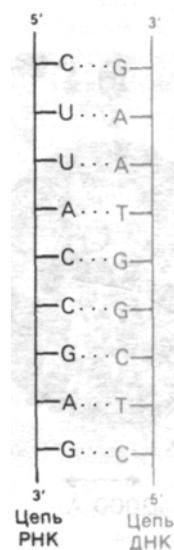


Рис. 25.5. Если РНК и ДНК имеют комплементарные последовательности, может образоваться гибрид РНК—ДНК.

ковые пробирки с образцами протыкали снизу и собирали фракции по каплям для дальнейшего анализа.

В результате были обнаружены три полосы (рис. 25.6). Полоса с наибольшей плотностью соответствовала одноцепочечной РНК. Вторая полоса соответствовала двухспиральной ДНК. Третья располагалась вблизи от полосы ДНК и состояла из двухцепочечных гибридных молекул ДНК—РНК. Итак, Т2-мРНК образовывала гибрид с Т2-ДНК. В отличие от этого Т2-РНК не гибридизовалась с ДНК многих бактерий и неродственных вирусов, даже если их нуклеотидный состав был подобен Т2-ДНК. Последующие эксперименты показали, что фракция мРНК из незараженных клеток гибридизуется с ДНК именно того организма, из которого она была выделена, но не с ДНК неродственных организмов. Эти убедительные эксперименты продемонстрировали, что *последовательность оснований мРНК комплементарна последовательности ДНК-матрицы. К тому же был разработан мощный метод, с помощью которого можно было исследовать поток генетической информации в клетках и выяснять, сходны ли две молекулы нуклеиновой кислоты.*

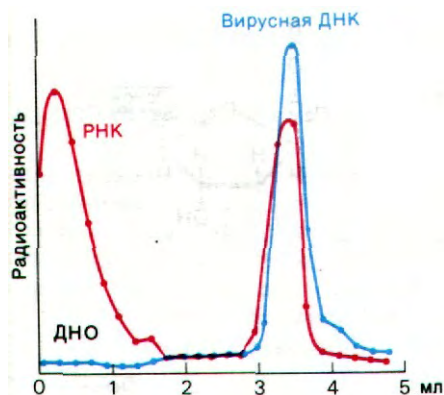
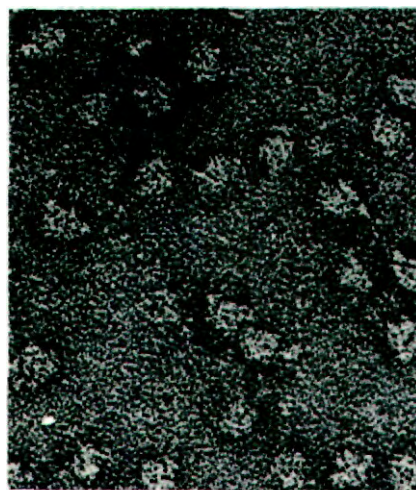


Рис. 25.6. РНК, образовавшаяся после заражения *E.coli* фагом Т2, комплементарна вирусной ДНК. В этих экспериментах по гибридизации РНК метили ^{32}P , а ДНК фага Т2 — ^3H . Распределение радиоактивности в градиенте плотности хлористого цезия показывает, что большая часть РНК, синтезированной после заражения, попадает в одну полосу с ДНК фага Т2. (Spiegelman S., Hybrid nucleic acids, Sci. Amer., 1964.)

25.6. Рибосомные РНК и транспортные РНК также синтезируются на ДНК-матрице

Метод гибридизации был использован затем, чтобы выяснить, синтезируются ли рРНК и тРНК также на ДНК-матрицах. Образование гибридов РНК—ДНК выявляли с помощью фильтров, а не центрифугированием в градиенте плотности, так как этот метод проще, чувствительнее и требует меньше времени. Одноцепочечные РНК проходят через нитроцеллюлозный фильтр, а двухспиральные ДНК и гибриды РНК—ДНК задерживаются на фильтре. РНК *E. coli* поместили изотопом ^{32}P и смешали с немеченой ДНК *E. coli*. Эту смесь нагревали, медленно охлаждали и затем отфильтровывали через нитроцеллюлозу. Радиоактивность, задержанную на фильтре, просчитывали. Результаты экспериментов не вызывали сомнений: *гибриды РНК—ДНК образовывались со всеми рРНК (5S, 16S и 23S) и тРНК. Отсюда следовало, что в геноме E. coli имеются последовательности, комплементарные этим молекулам РНК.*



500 Å

Рис. 25.7. Электронная микрофотография РНК-полимеразы *E. coli*. (Печатается с любезного разрешения д-ра Robley Williams и д-ра Michael Chamberlin.)

25. Информационная РНК и транскрипция

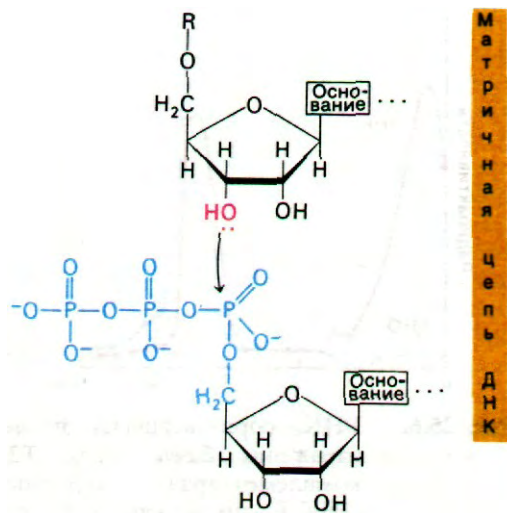


Рис. 25.8. Механизм реакции элонгации цепи, катализируемой РНК-полимеразой.

25.7. Все клеточные РНК синтезирует РНК-полимераза

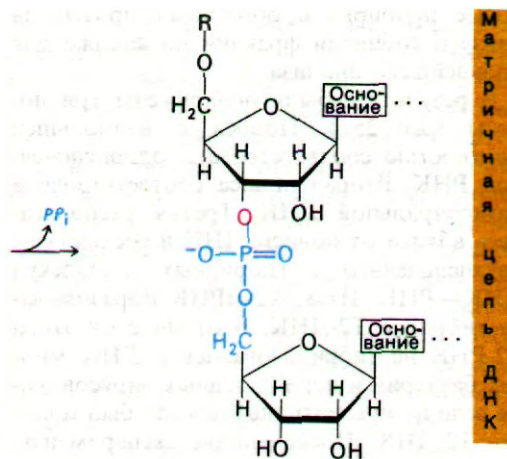
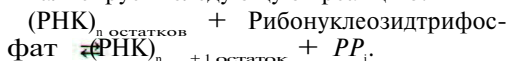
Концепция мРНК стимулировала поиски фермента, который синтезирует РНК в соответствии с последовательностью ДНК-матрицы. Стратегия эксперимента была такой же, как и при поиске ДНК-полимеразы I. В 1960г. Джерард Хёрвиц и Сэмюэл Вейсс (Jerard Hurwitz, Samuel Weiss) независимо открыли такой фермент. Они назвали его *РНК-полимеразой*. Ферменту из клеток *E. coli* (рис. 25.7) нужны были для синтеза РНК следующие компоненты.

1. *Матрица*. Предпочтительная матрица - *двухцепочечная ДНК*. Одноцепочечная ДНК также может служить матрицей. Ни РНК (как одноцепочечная, так и двухцепочечная), ни гибриды РНК—ДНК не могут служить эффективными матрицами.

2. *Активированные предшественники*. Необходимы все четыре *рибонуклеозидтрифосфата* - АТР, ГТР, УТР и СТР.

3. *Двухвалентные ионы металлов*. Фермент активен в присутствии Mg^{2+} или Mn^{2+} . *In vivo* эту потребность фермента удовлетворяет Mg^{2+} .

РНК-полимераза катализирует инициацию и элонгацию цепей РНК. Фермент катализирует следующую реакцию:



Синтез РНК во многих отношениях подобен синтезу ДНК (рис. 25.8). Во-первых, как будет вскоре показано более подробно, синтез идет в направлении $5' \rightarrow 3'$. Во-вторых, по-видимому, механизм элонгации сходен. Происходит нуклеофильная атака внутреннего фосфата очередного нуклеозидтрифосфата 3'-ОН-группой на конце растущей цепи. В-третьих, движущая сила синтеза - гидролиз пирофосфата.

Однако по некоторым важным особенностям синтез РНК отличается от синтеза ДНК. Во-первых, РНК-полимеразе не нужна затравка. Во-вторых, ДНК-матрица при синтезе РНК полностью сохраняется, тогда как при синтезе ДНК она сохраняется лишь наполовину. В-третьих, РНК-полимераза, насколько известно, не обладает никакими нуклеазными активностями.

Все три типа клеточной РНК *E. coli* - мРНК, тРНК и рРНК - синтезируются одной РНК-полимеразой в соответствии с инструкциями, заданными ДНК-матрицей. В клетках млекопитающих имеет место разделение труда между несколькими видами РНК-полимераз. Кроме того, необходимо отметить, что некоторые вирусы кодируют РНК-синтезирующие ферменты, совершенно отличные от ферментов клетки-хозяина. Таковы, например, РНК-полимераза, кодируемая ДНК-содержащим фагом Т7, и РНК-репликаза, кодируемая РНК-содержащим фагом Q β . Репликаза фага Q β является РНК-зависимой РНК-полимеразой, так как она синтезирует РНК не по ДНК-матрице, а по РНК (гл. 30). Клеточные же ферменты, синтези-

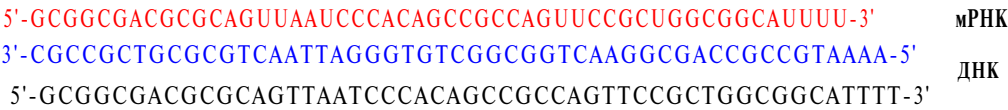


Рис. 25.9. Последовательность оснований мРНК комплементарна последовательности матричной ДНК. Показана часть последовательности триптофанового оперона.

рующие РНК, наоборот, представляют собой *ДНК-зависимые РНК-полимеразы*.

25.8. РНК-полимераза получает инструкции от ДНК-матрицы

Подобно ДНК-полимеразам, описанным в предыдущей главе, РНК-полимераза использует информацию, содержащуюся в ДНК-матрице. Первым доводом в пользу этого утверждения послужили данные о том, что нуклеотидный состав новосинтезированной РНК комплементарен составу матричной цепи ДНК. Если в качестве матрицы использовать синтетический полидезоксирибонуклеотид poly(dT), содержащий только остатки тимидиловой кислоты, то в синтезируемую полирибонуклеотидную цепь включается только один рибонуклеозидтрифосфат - АТР. Продукт реакции - полирибоаденилат [сокращенное обозначение poly(rA)]. Если в качестве матрицы для РНК-полимеразы используется сополимер с чередующимися основаниями poly(dA-dT), то включаются УТР и АТР, а в качестве продукта реакции образуется poly(rA-rU). Нуклеотидный состав РНК, синтезированной с использованием в качестве матрицы одноцепочечной ДНК фага фХ174, также свидетельствует о наличии комплементарности между РНК-продуктом и ДНК-матрицей (табл. 25.2). Эксперименты по гибридизации показывают, что РНК, синтезированная РНК-полимеразой,

комплементарна матричной ДНК. Наиболее убедительный довод в пользу надежности копирования ДНК при транскрипции получен при изучении последовательности оснований; оказалось, что последовательность мРНК в точности комплементарна последовательности матричной ДНК (рис. 25.9).

25.9. Обычно в данном участке генома транскрибируется только одна цепь ДНК Транскрибируются ли обе цепи двухспиральной матричной ДНК, или только одна? *A priori* кажется маловероятным, что в одном и том же участке ДНК обе цепи кодируют функциональные белки. Один из первых ответов на этот вопрос был получен при использовании метода гибридизации в опытах с *E. coli*, зараженной фагом фХ174. Частицы фага фХ174 содержат одноцепочечную ДНК, которую называют

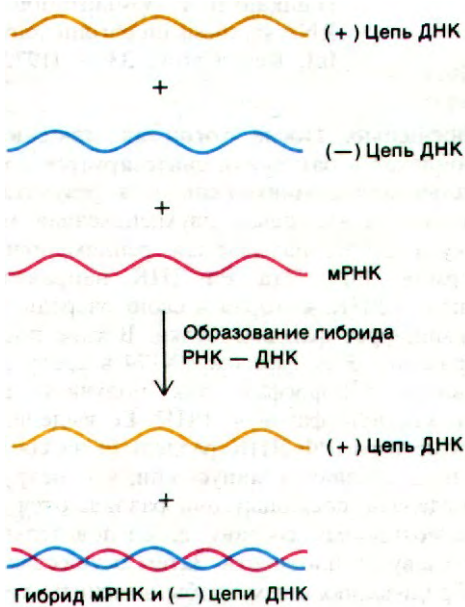


Рис. 25.10. Как показывает этот гибридизационный эксперимент, только одна цепь РФ-ДНК фага фХ174 используется в качестве матрицы при транскрипции.

Таблица 25.2. Нуклеотидный состав РНК, синтезированной на вирусной ДНК в качестве матрицы

ДНК-матрица (плюс-цепь фага фХ174)		РНК-продукт	
A	0,25	0,25	U
T	0,33	0,32	A
G	0,24	0,23	C
C	0,18	0,20	G

25. Информационная РНК и транскрипция

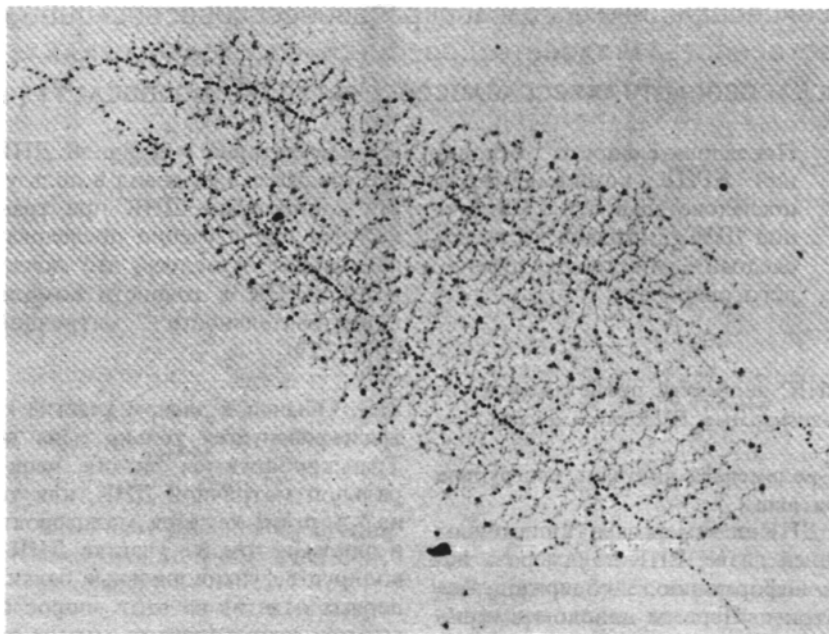


Рис. 25.11. Электронная микрофотография, на которой виден процесс транскрипции. [Miller O. L., Hamkalo B. A., Visualization of RNA synthesis on chromosomes, Int. Rev. Cytol., 33, 1 (1972).]

плюс-цепью. После того как плюс-цепь проникает в бактерию, синтезируется комплементарная минус-цепь, и в результате образуется кольцевая двухцепочечная молекула ДНК, называемая репликативной формой (РФ). Эта РФ-ДНК направляет синтез мРНК, которая в свою очередь детерминирует фаговые белки. Вскоре после заражения *E. coli* фагом ϕ X174 в среду добавляли ^{32}P -фосфат; так получили радиоактивную фаговую РНК. Ее выделили. Кроме того, РФ-ДНК разделили на составляющие плюс- и минус-цепи, что нетрудно сделать, поскольку они различаются по нуклеотидному составу и, следовательно, по плавучей плотности. Затем осуществили гибридизацию, с тем чтобы выяснить, комплементарна ли новосинтезированная мРНК плюс-цепи, или минус-цепи, или же обоим цепям. Был получен однозначный результат: только минус-цепь РФ-ДНК образовывала гибрид с меченой мРНК. Итак, *только одна цепь РФ-ДНК фага*

ϕ X174 служит in vivo матрицей для транскрипции.

Точно так же только одна цепь таких вирусов, как Т7, SP8 и α , транскрибируется *in vivo*. В случае таких вирусов, как фаги Т4 или λ , ситуация сложнее. В одних участках генома матрицей служит одна цепь, в других - другая. Такая же транскрипция с переменной матрицы в различных группах генов происходит и в клетках *E. coli*.

25.10. РНК-полимераза *E. coli* состоит из субъединиц

РНК-полимераза *E. coli* - очень большой и сложный фермент. Масса целого фермента равна примерно 500 кДа. РНК-полимераза состоит из отдельных субъединиц (табл. 25.3); это можно доказать, вызвав диссоциацию фермента в концентрированном растворе мочевины. Субъединичный состав целого фермента, называемого *голоферментом*, - $\alpha_2\beta\beta'\sigma$. Как это видно из

Таблица 25.3. Субъединицы РНК-полимеразы *E. coli*

Обозначение субъединицы	Число субъединиц	Масса, кДа
α	2	40
β	1	155
β'	1	165
σ	1	95

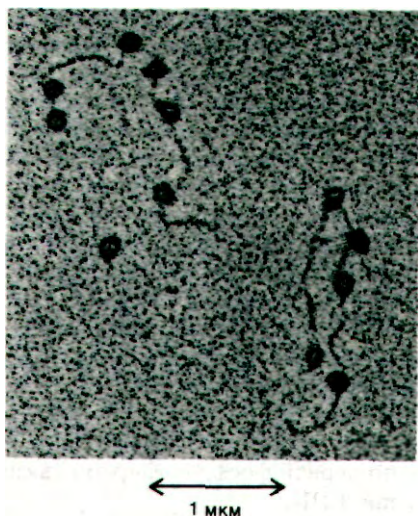


Рис. 25.12. Электронная микрофотография РНК-полимеразы-голофермента, связанного со многими промоторными участками фрагмента ДНК фага Т7. [Williams R.C., Proc. Nat. Acad. Sci., 74, 2313 (1977).]

последующего текста, после того как инициация синтеза РНК произошла, σ -субъединица отделяется от фермента. РНК-полимераза без σ -субъединицы называется *минимальным ферментом* или *кор-ферментом* ($\alpha_2\beta\beta'$). Каталитический участок РНК-полимеразы находится в кор-ферменте. Установлено, что β' -субъединица участвует в связывании с ДНК-матрицей, а β -субъединица - в связывании субстратов - рибонуклеозидтрифосфатов. σ -Субъединица голофермента участвует в выборе участка инициации транскрипции.

Синтез РНК РНК-полимеразой *E. coli* происходит в три этапа, называемых 1) *инициация*, 2) *элонгация* и 3) *терминация*. С этими процессами мы познакомимся несколько ниже.

25.11. Транскрипция иницируется на промоторных участках матричной ДНК

Транскрипция начинается в определенных участках матричной ДНК, называемых *промоторами*. Как РНК-полимераза находит эти участки? Один из подходов к решению этой проблемы состоит в том, чтобы выделить те фрагменты, которые голофермент РНК-полимеразы защищает от расщепления панкреатической дезокси-

рибонуклеазой, и определить в этих фрагментах последовательность нуклеотидов. Другой подход сводится к тому, чтобы исследовать ряд мутантов с повышенной или пониженной интенсивностью транскрипции определенных генов. В результате таких исследований было установлено, что промоторные участки состоят примерно из сорока пар оснований, что соответствует фрагменту ДНК длиной примерно 140 А. Как показал анализ различных промоторов *E. coli* и фагов, функцию сигнала узнавания в основном выполняет последовательность семи пар оснований, середина которой находится на расстоянии примерно 10 нуклеотидов перед точкой, с которой начинается кодирование мРНК (рис. 25.13). Второй участок узнавания расположен на расстоянии около 35 нуклеотидов перед точкой начала мРНК; он также участвует в первоначальном связывании РНК-полимеразы.

25.12. σ -Субъединица обеспечивает узнавание промоторных участков РНК-полимеразой

Кор-фермент ($\alpha_2\beta\beta'$) РНК-полимеразы не может начинать транскрипцию в промоторных участках. Для *специфической инициации* необходим *голофермент* $\alpha_2\beta\beta'\sigma$. Роль сигма-субъединицы была открыта следующим образом. Если РНК-полимеразу очищали хроматографией на колонке с фосфоцеллюлозой, то она была практи-

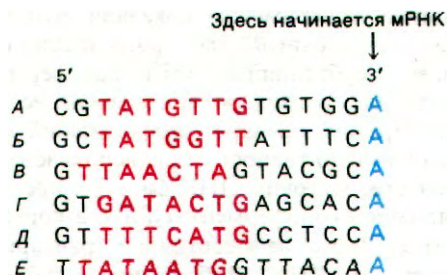


Рис. 25.13. Промоторные последовательности лактозного (А), галактозного (Б) и триптофанового (В) оперонов *E. coli*, фагов λ (Г) и $\phi X174$ (Д) и вируса SV-40 (Е). Предполагаемая область гомологии, так называемая последовательность Прибнова (Pribnow), показана зеленым.

25. Информационная РНК и транскрипция



Рис. 25.14. Разделение РНК-полимеразы на σ -субъединицу и кор-фермент (минимальный фермент; α, β, β') на колонке с фосфоцеллюлозой.

чески лишена активности при использовании в качестве матрицы ДНК фага Т4, но сохраняла активность в опытах с ДНК из тимуса телят. Наряду с этим та же РНК-полимераза, очищенная центрифугированием в градиенте концентрации глицерола, была, напротив, весьма активна на обеих матрицах. Из этого наблюдения можно было сделать вывод, что в препарате РНК-полимеразы, очищенной на фосфоцеллюлозе, не хватает какого-то фактора. Так оно и было (рис. 25.14). Активность фермента, очищенного на фосфоцеллюлозе, значительно увеличивается при добавлении другой фракции, элюирующейся с колонки. Этот стимулирующий фактор сам по себе не обладает каталитической активностью. Он был назван сигма (σ)-фактором. Последующие эксперименты показали, что фермент, очищенный на фосфоцеллюлозе, лишен σ -субъединицы, тогда как фермент, очищенный в глицероле, содержит ее. Таким образом, препарат, проявлявший максимальную активность при использовании в качестве матрицы ДНК фага Т4, представлял собой голофермент $\alpha, \beta, \beta', \sigma$ а кор-фермент α, β, β' был не в состоянии транскрибировать эту ДНК. Добавление σ -субъединицы к кор-ферменту приводило к реконструкции вполне активного голофермента. Кор-фермент обладал способностью транскрибировать ДНК тимуса телят, так как эта матрица содержит много одноцепочечных разрывов. РНК, синтезированная кор-полимеразой *in vitro*, не соответствует транскриптам, образующимся *in vivo*. В частности, кор-фермент транскрибирует

обе цепи фаговых ДНК-матриц, тогда как голофермент транскрибирует асимметрично одну цепь, как он это делает *in vivo*.

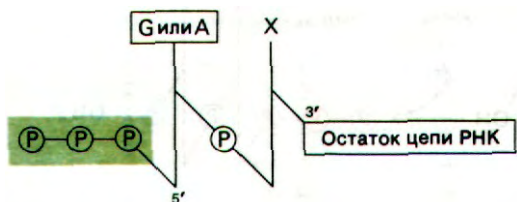
Сигма-субъединица обеспечивает специфическую инициацию, снижая в 10^4 раз сродство РНК-полимеразы к ДНК, не содержащей промоторов. Кроме того, сигма-субъединица активирует узнавание промоторных последовательностей РНК-полимеразой. Наконец, сигма-субъединица участвует в раскрытии двойной спирали ДНК, так чтобы одна из цепей могла служить матрицей. При связывании голофермента РНК-полимеразы расплетается примерно один виток спирали ДНК. Так происходит подготовка фермента к образованию первой фосфодиэфирной связи новой цепи РНК.

После того как начинается синтез новой цепи РНК, сигма-субъединица отделяется от голофермента. Кор-фермент продолжает транскрибировать матрицу ДНК. Таким образом, функция голофермента — поиск промотора и инициация, а функция кор-фермента — элонгация. Отделившаяся сигма-субъединица присоединяется к другой молекуле кор-полимеразы, чтобы участвовать в инициации нового цикла транскрипции.

Инициация новых цепей РНК регулируется многими способами. Некоторые промоторные последовательности обеспечивают высокую эффективность инициации, другие менее эффективны. Кроме того, эффективность инициации регулируется белками, которые связываются с самим промоторным участком или рядом с ним. Репрессоры блокируют транскрипцию, препятствуя связыванию РНК-полимеразы, а факторы положительной регуляции способствуют инициации, облегчая связывание РНК-полимеразы. Эти важные регуляторные механизмы мы рассмотрим подробнее в гл. 28.

25.13. Цепи РНК начинаются с *pppG* или *pppA*

Большинство новосинтезированных цепей РНК содержат своего рода ярлычок, который показывает, с чего начался их синтез. Новые цепи РНК имеют строго определенную структуру 5'-конца: молекула начинается либо с *pppA*, либо с *pppG*. В отличие от синтеза ДНК затравка в этом случае не нужна. Цепи РНК могут образовываться *de novo*.



Этот ярлычок на 5'-конце был открыт двумя способами. Было обнаружено, что цепи РНК включают ^{32}P , если инкубационная смесь содержит меченный по γ -атому ^{32}P -АТР. Очевидно, что включенная метка должна быть локализована на конце, так как только α -атом фосфора нуклеозидтрифосфата может участвовать в образовании внутренних фосфодиэфирных мостиков РНК. Кроме того, при щелочном гидролизе новосинтезированной РНК образуются продукты трех типов: нуклеозиды, нуклеозид-2'-монофосфаты (или нуклеозид-3'-монофосфаты) и нуклеозид-тетрафосфаты (рис. 25.15). Если в качестве субстрата использовали γ - ^{32}P -АТР, образовывался аденозин-3'-фосфат-5'-трифосфат. γ -Атом фосфора этого нуклеозидтетрафосфата содержал метку. Аналогичный результат был получен с γ - ^{32}P -GTP. Однако, если взять γ -меченный CTP или UTP, радиоактивность не включается. Следовательно, *новообразованная цепь РНК имеет трифосфатную группу на 5'-конце и свободную ОН-группу на 3'-конце.*

в инкубационную смесь. Таким образом, ^{32}P включается в молекулу РНК в начале синтеза, а не в конце. *Следовательно, рост цепи РНК идет в направлении 5'—>3', как при синтезе ДНК.*

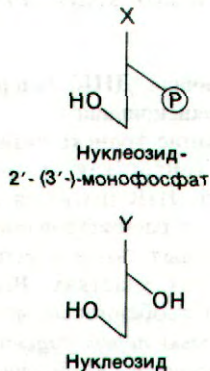
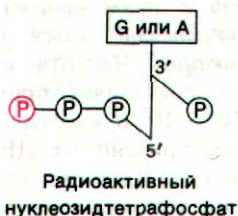
Кор РНК-полимеразы движется вдоль цепи матричной ДНК в направлении 3'—>—5', так как матричная цепь антипараллельна новосинтезированной цепи ДНК. Одна и та же молекула РНК-полимеразы синтезирует весь транскрипт — иными словами, транскрипция *процессивна*. По мере того как расплетается очередной участок ДНК, транскрибированный участок восстанавливает свою двухспиральную конформацию. Максимальная скорость элонгации составляет примерно 50 нуклеотидов в секунду.

Необходимо подчеркнуть, что РНК-полимераза не обладает нуклеазной актив-

25.14. Цепи РНК синтезируются

в направлении 5'—>3'

В каком направлении синтезируется РНК? В направлении 5'—>3' или 3'—>5'? Два противоположных механизма роста цепи проиллюстрированы на рис. 25.16. При росте в направлении 5'—>3' трифосфатный конец образуется в начале роста цепи, а при росте 3'—>5' трифосфатный конец появляется с последним включенным остатком. Кинетика включения радиоактивности в РНК, синтезированную из γ - ^{32}P -GTP (или АТР), указывает, какая из этих возможностей имеет место. Если в качестве субстрата использовать γ - ^{32}P -GTP, то отношение включения ^{32}P к общему включению нуклеотидов в продукт достигает максимума очень быстро после смешивания компонентов, а затем постепенно снижается во времени. При этом общая радиоактивность уже помеченной РНК не снижается при последующем добавлении большого избытка нерадиоактивного GTP



Нуклеозид

Рис. 25.15. Продукты щелочного гидролиза цепи РНК, меченной с помощью γ - ^{32}P -АТР.

25. Информационная РНК и транскрипция

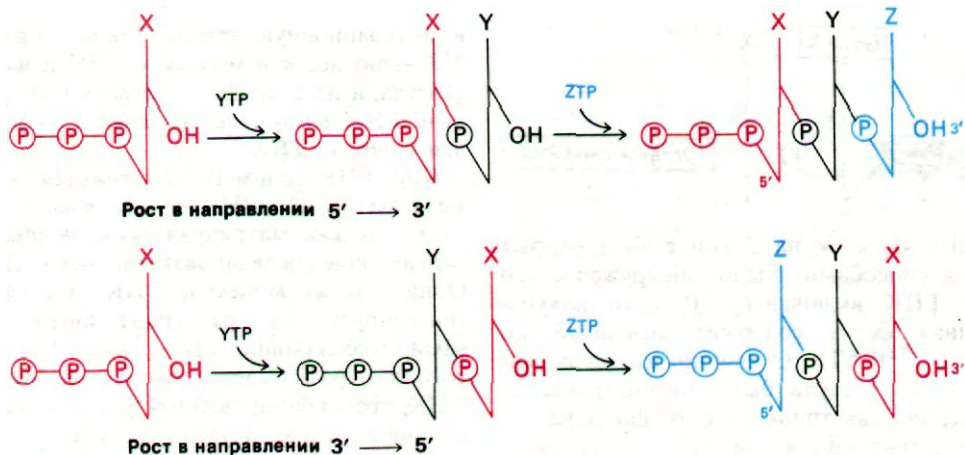


Рис. 25.16. Предполагаемое положение ^{32}P -метки в случае роста в направлении $5' \rightarrow 3'$ и $3' \rightarrow 5'$. Наблюдаемое в действительности положение метки показывает, что РНК синтезируется в направлении $5' \rightarrow 3'$.

ностью. В отличие от ДНК-полимеразы РНК-полимераза не проверяет правильности новообразованной полинуклеотидной цепи. В связи с этим надежность транскрипции значительно ниже, чем надежность репликации. Частота ошибок при синтезе РНК составляет примерно одну ошибку на 10^4 – 10^5 нуклеотидов, что в 10^5 раз выше, чем при синтезе ДНК. Гораздо более низкую надежность синтеза РНК клетка обходит тем, что с одного гена синтезируется много копий РНК-транскриптов.

25.15. Матричная ДНК содержит стоп-сигналы для транскрипции

Терминирование транскрипции регулируется так же тонко, как и инициирование. В матричной ДНК имеются стоп-сигналы, которые были расшифрованы путем сравнения различных последовательностей оснований в этих участках. Все они имеют одну общую особенность: *вслед за GC-богатой областью перед участком терминирования располагается AT-богатая последовательность*. Отличительная особенность терминирующих последовательностей — симметрия второго порядка этой GC-бога-

той области (рис. 25.17). Следовательно, РНК-транскрипт этой области самокомплементарен, а это значит, что он способен к спариванию оснований, приводящему к образованию структуры шпильки (рис. 25.18). Кроме того, *новообразованные цепи РНК кончаются несколькими остатками U*, которые кодируются серией оснований А в АТ-богатой области ДНК-матрицы. Одна или несколько подобных структурных особенностей заставляют РНК-полимеразу задержаться, сделать паузу, когда она сталкивается с таким сигналом. В некоторых участках терминирования новообразованные цепи РНК высвобождаются без участия дополнительных белков. В других местах для терминации цепи необходимо участие белка ρ (ро).

25.16. Белок ρ участвует в терминировании транскрипции

Тот факт, что терминирование транскрипции в некоторых участках происходит с участием белка ρ , подтверждается следующими данными: молекулы РНК, синтезированные *in vitro* в присутствии белка ρ , короче молекул, полученных в его отсутствие. Например, РНК, синтезированная на ДНК фага fd в присутствии белка ρ , имеет коэффициент седиментации 10S, тогда как РНК, синтезированная в отсутствие белка ρ , — 23S. Дополнительные сведения о действии белка ρ были получены при добавлении этого фактора терминации в инкубационную смесь через различные промежутки времени после начала синтеза РНК. Если белок ρ добавляли через несколько секунд, через 2 и 10 мин после инициации, получали РНК с коэффициентами седиментации 13, 17 и 23S соответственно. Этот ре-



Рис. 25.19. Влияние фактора ρ на размер транскрибируемых РНК.

25.17. Многие молекулы РНК после транскрипции расщепляются и химически модифицируются

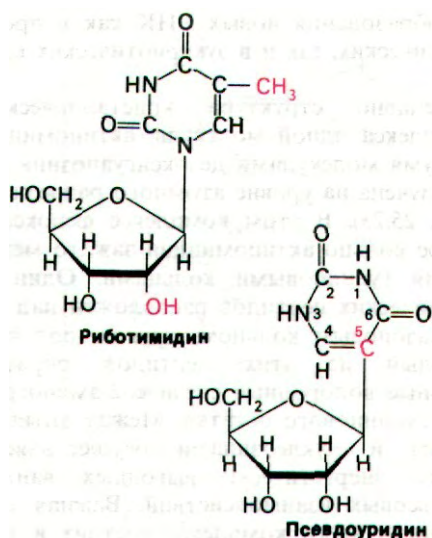
Образование функционально активных молекул РНК (процессинг) продолжается после завершения транскрипции. У прокариот молекулы транспортных и рибосомных РНК образуются путем расщепления и химической модификации определенных новосинтезированных цепей РНК. Например, у *E.coli* три вида молекул рибосомных РНК и одна молекула транспортной РНК вырезаются из первичного РНК-транскрипта, который, кроме того, содержит спейсерные (разграничивающие) участки (рис. 25.20). Другие транскрипты содержат по несколько различных видов тРНК или несколько копий одной и той же тРНК. Нуклеазы, которые расщепляют и укорачивают эти предшественники рРНК и тРНК, действуют с высокой точностью. Например, рибонуклеаза Р образует правильные 5'-концы всех молекул тРНК в клетке *E. coli*. Рибонуклеаза III вырезает предшественники 5S-, 16S- и 23S-рРНК из первичного транскрипта, расщепляя определенные связи в двухспиральных шпильчатых областях. Молекулы мРНК у прокариот, наоборот, практически не претерпевают модификации. Более того, многие из них транслируются еще до того, как заканчивается их транскрипция. В то же время некоторые вирусные мРНК (например, мРНК фага Т7) расщепляются рибонуклеазой III раньше, чем начинается трансляция.

Второй тип процессинга - присоединение нуклеотидов к концам некоторых РНК. Например, последовательность ССА присоединяется к 3'-концам молекул тРНК, которые еще не обладают этой концевой последовательностью. У эукариот к 3'-концу большинства молекул мРНК присоединяется длинная последовательность poly(A), а метилированный нуклеотид G (так называемый «колпачок», или «кеп») - к 5'-концу (разд. 29.22).

Модификации оснований и рибозных остатков представляют собой третий тип процессинга. У эукариот одна 2'-гидроксильная группа примерно на сто рибозных остатков в рРНК ферментативно метилируется за счет S-аденозилметионина. У бактерий в рРНК метилируются не остатки рибозы, а основания. Особенно интересны необычные основания, которые встречаются во всех молекулах тРНК (разд. 27.3). Они образуются путем фер-



ментативной модификации обычных рибонуклеотидов, входящих в состав предшественника тРНК. Например, псевдоуридат и риботимидилат образуются путем модификации уридиловых остатков после транскрипции.



У эукариот все транскрипты подвергаются интенсивному процессингу. Расщепление и модификация предшественников рРНК и тРНК напоминают соответствующие процессы у прокариот. Удивительное отличие состоит в том, что мРНК эукариот образуется путем расщепления большого транскрипта и последующего сращивания (сплайсинга) получающихся при этом фрагментов. Это явление мы рассмотрим в одной из следующих глав (разд. 29.21). У эукариот транскрипция и трансляция происходят в различных компартментах клетки. По всей вероятности, процессинг РНК играет ключевую роль в регуляции транспорта мРНК, рРНК и тРНК из ядра в цитозоль.

25.18. Антибиотики - ингибиторы транскрипции: рифамицин и актиномицин

Антибиотики - очень интересные молекулы, так как многие из них представляют собой весьма специфические ингибиторы биологических процессов. Актиномицин и рифамицин - два антибиотика, ингибирующих

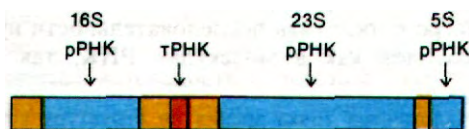
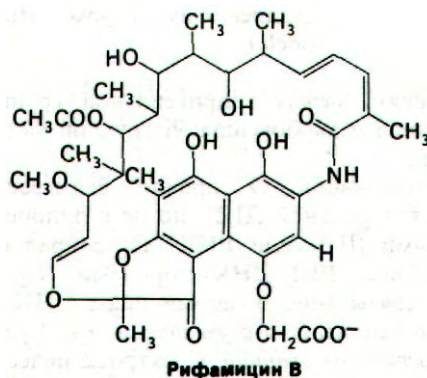


Рис. 25.20. При расщеплении этого первичного транскрипта образуются молекулы 5S, 16S и 23S рРНК и одна молекула тРНК. Спейсерные участки закрашены желтым цветом.

транскрипцию совершенно различным путем. Рифамицин, образуемый бактериями *Streptomyces*, и его полусинтетическое производное рифампицин *специфически ингибируют инициацию синтеза РНК*. Эти антибиотики не предотвращают связывания РНК-полимеразы с ДНК-матрицей. Рифампицин препятствует образованию первой фосфодиэфирной связи в цепи РНК. При этом антибиотик практически не влияет на элонгацию цепи. Столь высокая избирательность ингибирующего действия делает рифампицин ценным инструментом в молекулярно-биологических исследованиях. Например, его можно использовать для подавления инициации новых цепей РНК, не затрагивая транскрипции тех цепей, синтез которых уже начался. Мишенью для рифампицина, видимо, служит β -субъединица РНК-полимеразы. Были выделены мутанты *E. coli*, устойчивые к рифампицину (так называемые *rif-r-мутанты*). В некоторых из них электрофоретическая подвижность β -субъединицы изменена.

Механизм действия актиномицина D (со-



державшего полипептиды антибиотика, продуцируемого микроорганизмом *Streptomyces*) совершенно отличен от механизма действия рифампицина. Актиномицин D прочно связывается с двухспиральной ДНК и за счет этого подавляет ее активность в качестве матрицы для синтеза РНК. Он состоит из двух идентичных циклических пептидов, соединенных феноксазоновой системой колец (рис. 25.22). Состав этих циклических пептидов необычен: они содержат саркозин, метилвалин и D-валин. Кроме того, в их молекуле имеется эфир-

25. Информационная РНК и транскрипция

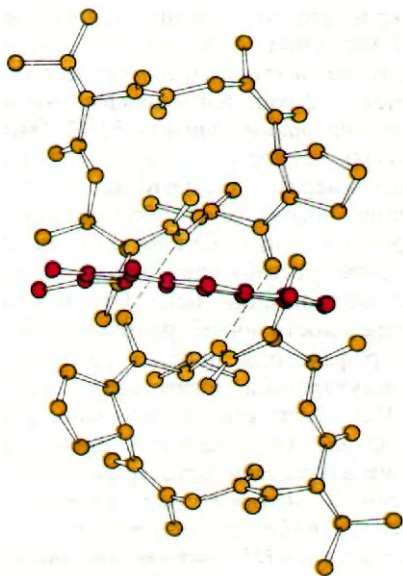


Рис. 25.21. Пространственная модель структуры актиномицина D. Феноксазоновое кольцо обозначено красным цветом, циклические пептиды - желтым. (По рисунку, любезно предоставленному д-ром Henry Sobell.)

ная связь между гидроксильной группой треонина и карбоксильной группой метилвалина.

Актиномицин D прочно связывается с двухспиральной ДНК, но не с одноцепочечными ДНК или РНК, двухспиральной РНК или РНК-ДНК-гибридами. Кроме того, связывание актиномицина с ДНК заметно усиливается с увеличением содержания остатков гуанина. Спектроскопические и гидродинамические исследования комплексов актиномицина D с ДНК свидетельствуют о том, что феноксазоновое кольцо актиномицина проникает в ДНК между двумя соседними парами оснований. Такой способ связывания называется *интеркаляцией* (рис. 25.23). При низких концентрациях актиномицин D ингибирует транскрипцию, не оказывая сколько-нибудь существенного влияния на репликацию ДНК. На синтез белка непосредственно актиномицин также не влияет. Благодаря этому актиномицин D широко использовался в качестве специфического ингибито-

ра образования новых РНК как в прокариотических, так и в эукариотических клетках.

Недавно структура кристаллического комплекса одной молекулы актиномицина с двумя молекулами дезоксигуанозина была изучена на уровне атомного разрешения (рис. 25.23). В этом комплексе феноксазоновое кольцо актиномицина зажато между двумя гуаниновыми кольцами. Один из циклических пептидов расположен над феноксазоновым кольцом, другой - под ним. Каждый из этих пептидов образует сильные водородные связи с 2-аминогруппой гуанинового остатка. Между антибиотиком и нуклеозидами осуществляется много энергетически выгодных вандерваальсовых взаимодействий. Важная особенность этого комплекса состоит в том, что он почти симметричен. Ось симметрии второго порядка проходит вдоль линии, соединяющей средние атомы O и N феноксазонового кольца. Конформация всего комплекса показывает, что *актиномицин узнает в ДНК последовательность оснований GrC*. Обратите внимание, что если в одной цепи ДНК имеется последовательность 5'GrC3', то в комплементарной цепи последовательность будет 3'CrG5'. По-видимому, актиномицин интеркалирует в ДНК между двумя GC-парами оснований и взаимодействует с остатками G в основном таким же образом, как и в комплексе с динуклеотидом. Согласно этой модели, циклические пептидные остатки локализованы в малой бороздке спирали ДНК. *Главная особенность этой модели состоит в том, что симметрия молекулы актиномицина соответствует симметрии определенной последовательности в ДНК¹.*

25.19. Разработаны совершенные методы определения последовательности нуклеотидов в РНК

Высокая разрешающая способность метода гель-электрофореза дает возможность быстро определять последовательности нуклеотидов как в молекулах РНК, так и

¹ Изложенная точка зрения на структуру комплекса актиномицина D с ДНК не является общепризнанной. Существует и другая гипотеза, согласно которой актиномицин не интеркалирует в ДНК, а связывается в малой бороздке, причем структура комплекса актиномицина D с динуклеотидом GrC не отражает структуры его комплексов с протяженными молекулами ДНК. - Прим. перев.

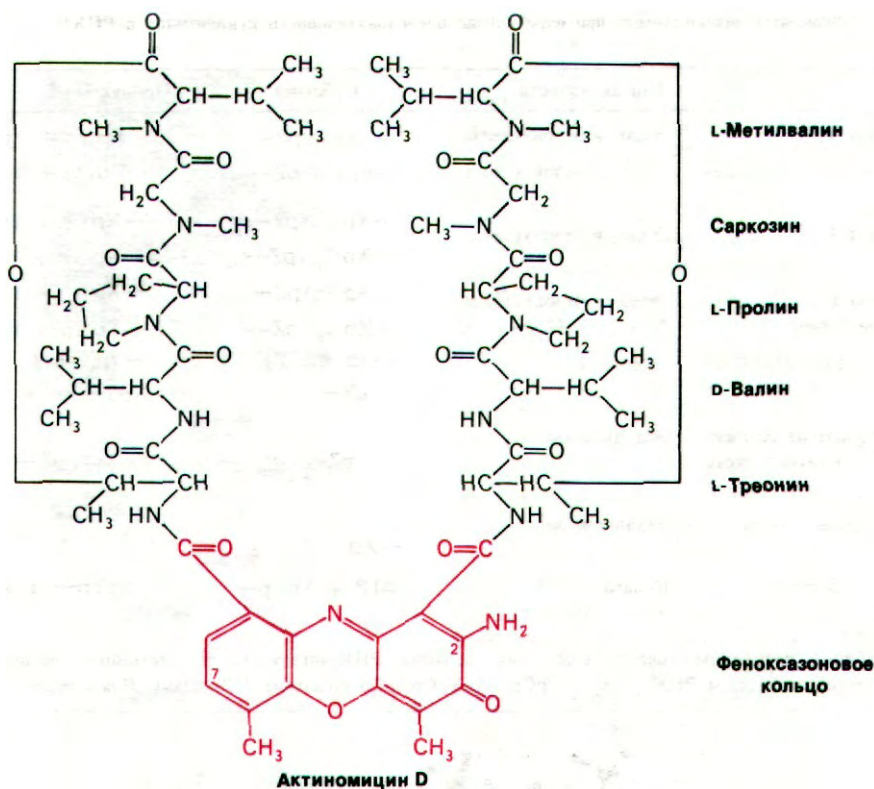


Рис. 25.22. Структура актиномицина D.

в молекулах ДНК. Для этого 3'- или 5'-конец цепи РНК метят радиоактивной группой. Затем меченую цепь частично расщепляют по одному из четырех оснований, чтобы получить набор фрагментов. Специфическое (или избирательное) расщепление можно провести с помощью ферментов, *специфичных к определенному основанию эндонуклеаз* (табл. 25.4). Например, рибонуклеаза T₁ гидролизует РНК с 3'-стороны остатков G. Кроме того, РНК можно специфически расщепить с помощью *химической модификации одного из четырех оснований*. Затем остов расщепляют в месте, где расположено модифицированное основание. После этого четыре набора фрагментов разделяют гель-электрофорезом и последовательность оснований РНК читают непосредственно с радиоавтографа (рис. 25.24), как и в случае ДНК (разд. 24.28). Эти подходы позволяют легко определять в молекулах РНК последовательность 100-200 нуклеотидов.

Другая стратегия сводится к тому, чтобы *определять последовательность нуклеотидов не в самой РНК, а в комплементарной ДНК*. Но как получить комплементарные фрагменты ДНК? Один из методов состоит в следующем. С помощью рестрикционных эндонуклеаз фрагментируют большие молекулы ДНК. Затем методом *гибридизации* идентифицируют рестрикционные фрагменты, содержащие последовательность, комплементарную исследуемой РНК. В другом случае комплементарную ДНК синтезируют ферментативно по РНК-матрице с помощью *обратной транскриптазы* из опухолеродных вирусов (разд. 30.19). Именно так была расшифрована полная последовательность 576 нуклеотидов мРНК, кодирующей β-цепь гемоглобина человека.

Закключение
Поток генетической информации в нормальных клетках происходит в направлении: ДНК→РНК→белок. Синтез РНК по ДНК-матрице называется транскрипцией, а синтез белка по РНК-матрице - трансляцией. Существует три типа молекул:

25. Информационная РНК и транскрипция

Таблица 25.4. Ферменты, используемые при определении последовательности нуклеотидов в РНК¹⁾

Фермент	Тип активности	Субстрат	Продукты
Рибонуклеаза T ₁	Эндо- и экзонуклеаза	—XpGpYpZ—	—XpGp + YpZ—
Панкреатическая рибонуклеаза	Эндо- и экзонуклеаза	—XpUpYpZ—	—XpUp + YpZ—
Рибонуклеаза U ₂	Эндо- и экзонуклеаза	—XpCpYpZ— —XpGpYpZ—	—XpCp + YpZ— —XpGp + YpZ—
Рибонуклеаза I (из <i>P. polycephalum</i>)	Эндо- и экзонуклеаза N = A, G, U, но не C	—XpApYpZ— —XpNpYpZ—	—XpAp + YpZ— —XpNp + YpZ—
Щелочная фосфатаза (из <i>E. coli</i>)	Фосфатаза	—YpZp pXpY—	—YpZ + P _i XpY— + P _i
Фосфодиэстераза из селезенки крупного рогатого скота	Экзонуклеаза	XpYpZ—	Xp + YpZ—
Фосфодиэстераза змеиного яда	Экзонуклеаза	—XpYpZ	—XpY + pZ
Полинуклеотидкиназа	Киназа	ATP + XpYp—	pXpYp— + ADP

¹⁾ В эту таблицу необходимо внести еще один фермент - РНК-лигазу. С его помощью осуществляется включение метки в 3'-концы РНК: —XpY + pCp—>XpYpCp (pCp содержит ³²P-метку).- Прим. перев.

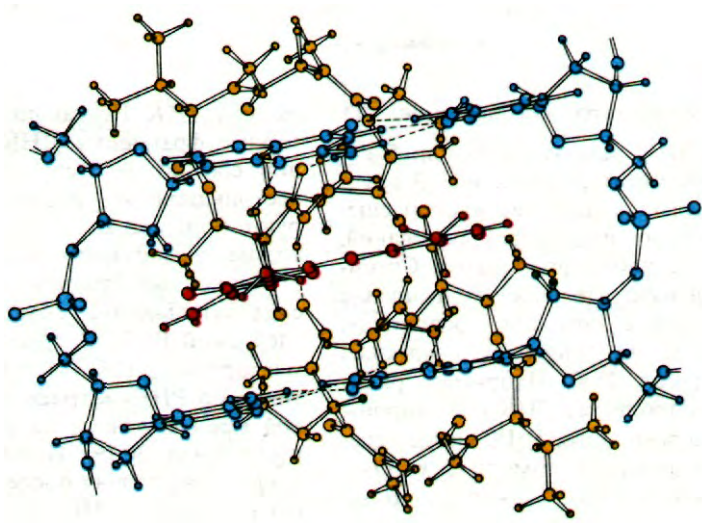


Рис. 25.23. Предполагаемая структура комплекса актиномицина D с ДНК. Феноксазоновое кольцо актиномицина (показано красным цветом) интеркалирует между двумя GC-парами ДНК (показаны синим цветом). Циклические пептиды актиномицина D (желтые) связывают-

ся с малой бороздкой спирали ДНК. Между актиномицином D и соседними гуанинами возникает несколько водородных связей. Ось симметрии субъединиц актиномицина D совпадает с осью симметрии сахарофосфатного остова и последовательности оснований ДНК. (По рисунку, любезно предоставленному д-ром Henry Sobell.)

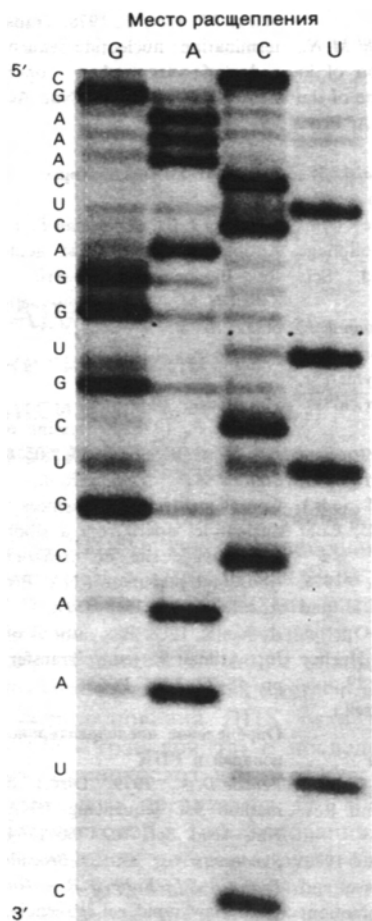


Рис. 25.24. Радиоавтограф фрагмента 5S-РНК дрожжей. 3'-конец помечен радиоактивной меткой. Четыре дорожки соответствуют расщеплению по остаткам G, A, C и U. На геле можно прочесть последовательность 5'-CGAAACUCAGGUGCUGCAAUC-3'. [Peattie D. A., Proc. Nat. Acad. Sci., **76**, 1762 (1979).]

кул РНК: информационная РНК (мРНК), транспортная РНК (тРНК) и рибосомная РНК (рРНК). Все эти РНК одноцепочечные. Транспортная РНК и рибосомная РНК содержат протяженные двухспиральные участки, которые образуются при складывании цепи в шпильки. Самыми маленькими молекулами РНК являются тРНК; они содержат около 75 нуклеотидов. Самые длинные молекулы РНК встре-

чаются среди мРНК; они могут содержать более 5000 нуклеотидов. Последовательность нуклеотидов в длинных цепях РНК можно определить, расщепляя их и разделяя фрагменты гель-электрофорезом.

Все клеточные РНК синтезирует РНК-полимераза в соответствии с последовательностью ДНК-матрицы. Активированными промежуточными продуктами служат рибонуклеозидтрифосфаты. Синтез РНК, как и синтез ДНК, происходит в направлении 5'→3'. РНК-полимераза отличается от ДНК-полимеразы тем, что не нуждается в затравке и не обладает нуклеазными активностями. Еще одно отличие состоит в том, что ДНК-матрица при синтезе РНК полностью сохраняется, тогда как при синтезе ДНК она сохраняется наполовину. РНК-полимераза *E. coli* имеет субъединичную структуру $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ и массу, достигающую 500 кДа. Кор-фермент имеет состав $\alpha_2\beta\beta'$. Сигма-субъединица увеличивает скорость и специфичность транскрипции, так как она обеспечивает узнавание РНК-полимеразой сигналов начала транскрипции в матричной ДНК. Связывание РНК-полимеразы с такими промоторными участками вызывает локальное расплетание матрицы, что создает условия для образования первой фосфодиэфирной связи. Цепи РНК начинаются с pppG или pppA. После инициации синтеза новой цепи сигма-субъединица отделяется от голофермента. Терминация транскрипции так же тонко регулируется, как и инициация. Матричная ДНК содержит стоп-сигналы транскрипции. Некоторые из этих сигналов узнает белок ρ . Некоторые специфические ингибиторы могут блокировать транскрипцию. Например, антибиотик рифампицин ингибирует инициацию синтеза РНК, а актиномицин D блокирует элонгацию РНК. Многие молекулы РНК подвергаются после транскрипции расщеплению и химической модификации (например, метилируются). У прокариот молекулы тРНК и рРНК подвергаются интенсивному процессингу, а молекулы мРНК почти не претерпевают модификаций. У эукариот все транскрипты сильно модифицируются.

25. Информационная РНК и транскрипция

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Miller O. 1973. The visualization of genes in action, *Sci. Amer.*, 228(3), 34-42.

Spiegelman S., 1964. Hybrid nucleic acids, *Sci. Amer.*, 210(5), 48-56.

Chamberlin M.J., 1976. RNA polymerase: an overview. In: Losick R. and Chamberlin M. (eds.), *RNA Polymerase*, pp. 17-67, Cold Spring Harbor Laboratory.

Открытие информационной РНК

Jacob F., Monod J., 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins, *J. Mol. Biol.*, 3, 318-356.

Brenner S., Jacob F., Meselson M., 1961. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis, *Nature*, 190, 576-581.

Hall B.D., Spiegelman S., 1961. Sequence complementarity of T2-DNA and T2-specific RNA, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 47, 137-146.

РНК-полимераза

Losick R., Chamberlin M. (eds.), 1976. *RNA Polymerase*, Cold Spring Harbor Laboratory. (Книга содержит ряд превосходных статей.)

Chamberlin M.J., 1974. The selectivity of transcription, *Ann. Rev. Biochem.*, 43, 721-776.

Travers A., 1976. RNA polymerase specificity and the control of growth, *Nature*, 263, 641-646.

Иницирование транскрипции

Hayashi M., Hayashi M.N., Spiegelman S., 1963. Restriction of in vivo genetic transcription to one of the complementary strands of DNA, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 50, 664-672.

Taylor K., Hradecna Z., Szybalski W., 1967. Asymmetric distribution of the transcribing regions on the complementary strands of coliphage λ DNA, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 57, 1618-1625.

Burgess R.R., Travers A.A., Dunn J.J., Bautz E.K.F., 1969. Factor stimulating transcription by RNA polymerase, *Nature*, 221, 43-46. (Открытие сигма-фактора.)

Gilbert W., 1976. Starting and stopping sequences for the RNA polymerase. In: Losick R. and Chamberlin M. (eds.), *RNA Polymerase*, pp. 193-205, Cold Spring Harbor Laboratory.

Reznikoff W.S., Abelson J.N., 1978. The *lac* promoter. In: Miller J. H. and Reznikoff W. S. (eds.), *The Operon*, pp. 221-243, Cold Spring Harbor Laboratory. (Сопоставляются 29 промоторных последовательностей.)

Терминирование транскрипции

Adhya S., Gottesman M., 1978. Control of transcription termination, *Ann. Rev. Biochem.*, 47, 967-996.

Das A., Merrill C., Adhya S., 1978. Interaction of RNA polymerase and rho in transcription termination: coupled ATPase, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 75, 4828-4832.

Wu A.M., Platt T., 1978. Transcription termination: nucleotide sequence at 3' end of tryptophan operon in *Escherichia coli*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 75, 5442-5446.

Антибиотики - ингибиторы синтеза РНК

Goldberg J.H., Friedman P.A., 1971. Antibiotics and nucleic acids, *Ann. Rev. Biochem.*, 40, 775-810.

Sobell H.M., 1974. How actinomycin binds to DNA, *Sci. Amer.*, 231(2), 82-91.

Процессинг РНК

Perry R.P., 1976. Processing of RNA, *Ann. Rev. Biochem.*, 45, 605-630.

Steitz J.A., Young R.A., 1978. Complementary sequences 1700 nucleotides apart from a ribonuclease III cleavage site in *Escherichia coli* ribosomal precursor RNA, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 75, 3593-3597.

Altman S., 1978. Biosynthesis of tRNA. In: Altman S. (ed.), *Transfer RNA*, pp. 48-77, MIT Press.

Определение последовательности оснований в РНК

Peattie D.A., 1979. Direct chemical method for sequencing RNA, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 76, 1760-1764.

Simonsis A., Brownlee G.G., Brown R.S., Rubin J.R., Guillely H., 1977. New rapid gel sequencing method for RNA, *Nature*, 269, 833-836.

Вопросы и задачи

1. Сравните ДНК-полимеразу I и РНК-полимеразу *E. coli* по каждому из следующих свойств.

- а) Субъединичная структура.
- б) Активированные предшественники.
- в) Направление элонгации цепи.
- г) Нуклеазные активности.
- д) Сохранение матрицы.
- е) Потребность в затравке.
- ж) Энергетика реакции элонгации.

2. Напишите последовательность молекулы мРНК, синтезированной на матричной цепи ДНК со следующей последовательностью:

5'-ATCGTACCGTTA-3'.

3. РНК легко гидролизуется щелочью, а ДНК нет. Почему?

4. Каким образом кордицепин (3'-дезоксиаденозин) блокирует синтез РНК?

5. Какие продукты должны получиться при частичном гидролизе олигорибонуклеотида

5'-pGCAGUACUGUC-3' следующими ферментами:

- а) панкреатической рибонуклеазой,
- б) рибонуклеазой T₁,
- в) рибонуклеазой U₂,
- г) рибонуклеазой I из *Physarum*!

6. Исчерпывающий гидролиз олигорибонуклеотида панкреатической рибонуклеазой дает следующие продукты: Ср 2Up, AGCp и GAAUp. Гидролиз того же олигонуклеотида рибонуклеазой T₁ дает AAUp, UAGp и CCUGp. Какова его последовательность?

Дополнительные вопросы см.: Wood W. B., Wilson J.H., Benbow R.M., Hood L.E. *Biochemistry: A Problem Approach*, ens. 16, 17 Benjamin, 1974, chs. 16,17.

ГЛАВА 26

Генетический код и зависимость между генами и белками

В главе 25 была описана роль информационной РНК в качестве посредника между геном и его полипептидным продуктом. В настоящей главе мы рассмотрим дальнейший поток информации от гена к белку. В центре внимания находится генетический код, связывающий последовательность оснований ДНК (или соответствующего транскрипта) с последовательностью аминокислот в белке. Код универсален для всех организмов. Он восхищает своей простотой. Три основания, составляющие кодон, детерминируют одну аминокислоту. Кодоны считываются последовательно молекулами транспортных РНК (тРНК), играющих при синтезе белка роль адаптеров. Полная расшифровка генетического кода в 60-х годах - одно из выдающихся достижений современной биологии.

26.1. Транспортная РНК - адапторная молекула в синтезе белка

Мы уже видели, что мРНК служит матрицей для синтеза белка. Каким образом она осуществляет соединение аминокислот в правильном порядке? В 1958 г. Фрэнсис Крик (Francis Crick) писал:

«Одно из первых предположений, довольно наивных, состояло в том, что РНК будет принимать конфигурацию, способную образовать двадцать различных «полостей», по одной для боковой цепи каждой из двадцати аминокислот. Если бы это было так, можно было бы попробовать проиграть эту задачу в обратном направлении, т.е. найти необходимую конфигурацию РНК, пытаясь воссоздать форму этих полостей.

Все подобные попытки закончились неудачей. Физико-химические соображения также не дают никаких оснований считать это предположение правдоподобным.»

Крик отметил, что РНК не имеет выпуклых гидрофобных поверхностей, позволяющих отличить валин от лейцина и изолейцина, и не содержит соответствующим образом расположенных заряженных групп, чтобы различать положительно и отрицательно заряженные боковые цепи аминокислот. Затем Крик предлагает принципиально иной механизм для узнавания мРНК:

«РНК - это прежде всего последовательность участков, способных образовывать водородные связи. Поэтому независимо от того, что именно связывается с матрицей *специфичным* образом, связывание, очевидно, происходит путем образования водородных связей. Следовательно, естественно предположить, что аминокислоты переносятся к матрице адапторными молекулами и что именно адаптор соответствует РНК. В простейшем случае потребуется 20 адаптеров, по одному на каждую аминокислоту».

Эта новаторская гипотеза вскоре стала доказанным фактом. *Роль адаптера в белковом синтезе играет тРНК.* Структура этих замечательных адапторных молекул и реакции, в которых они участвуют, рассматриваются подробно в следующей главе. Здесь же достаточно отметить, что в тРНК имеются *место прикрепления аминокислот* и *участок узнавания матрицы* (рис. 26.1 и 26.2). Молекула тРНК переносит определенную аминокислоту в активированной форме к месту синтеза белка. Карбоксильная группа аминокислоты связана эфирной связью с 3'-гидроксильной

или 2'-гидроксильной) группой рибозного остатка, расположенного на 3'-конце цепи тРНК. Во время синтеза белка связанная аминокислота может перемещаться с 2'- на 3'-гидроксильную группу и обратно. Присоединение аминокислоты к тРНК с образованием аминоацил-тРНК катализируется особым ферментом, называемым аминоацил-тРНК-синтетазой (или активирующим ферментом). Эта реакция этерификации идет за счет энергии АТФ. Для каждой из 20 аминокислот имеется по крайней мере одна специфическая синтетаза. Участок узнавания матрицы в тРНК представляет собой последовательность из трех оснований, называемую *антикодоном* (рис. 26.2). Антикодон тРНК узнает *кодон*, т.е. комплементарную последовательность из трех оснований в мРНК.

26.2. Аминокислоты кодируются группами из трех оснований, начиная со строго определенной точки

Генетический код связывает последовательность оснований в ДНК (или в соответствующих транскриптах) и последовательность аминокислот в белках. К 1961 г. благодаря экспериментам Фрэнсиса Крика, Сиднея Бреннера (Francis Crick, Sydney Brenner) и других исследователей были установлены следующие свойства генетического кода.

1. *Чему равно кодирующее отношение?* Поскольку в ДНК имеется четыре вида оснований, то при кодировании одной аминокислоты одним основанием могло бы кодироваться всего лишь четыре аминокислоты. При кодировании одной аминокислоты двумя основаниями кодировалось бы 16 аминокислот ($4 \cdot 4 = 16$), а при кодировании тремя основаниями - 64 аминокислоты ($4 \cdot 4 \cdot 4 = 64$). Белки состоят из двадцати аминокислот основного набора. Из этого несложного подсчета было очевидно, что для кодирования одной аминокислоты, видимо, необходимы три или более оснований. Генетические эксперименты показали, что *на самом деле одну аминокислоту кодирует группа из трех оснований*. Эта группа оснований называется *кодоном*.

2. *Является ли код перекрывающимся?* В случае непрерывающегося триплетного кода каждая группа из трех оснований ко-

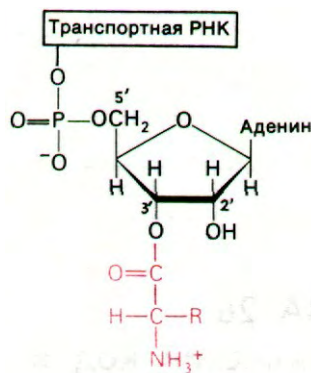


Рис. 26.1.

Присоединение аминокислоты (показана красным цветом) к молекуле тРНК. Аминокислота связана эфирной связью с 3'-гидроксильной группой концевого аденозина РНК. Молекула тРНК, несущая ковалентно привязанную аминокислоту, называется аминоацил-тРНК или «нагруженная» тРНК, а тРНК без аминокислоты - «ненагруженная».

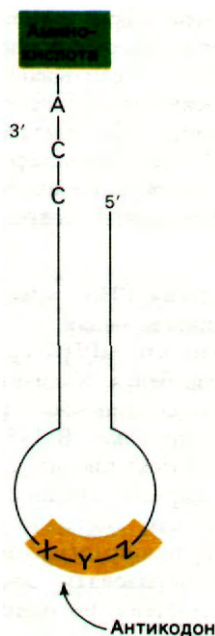


Рис. 26.2.

Схематическое изображение аминоацил-тРНК. Показаны участок прикрепления аминокислоты и антикодон (участок узнавания матрицы).

дирует только одну аминокислоту, тогда как в случае полностью перекрывающегося триплетного кода АБВ кодирует первую аминокислоту, БВГ-вторую, ВГД-третью и т.д.

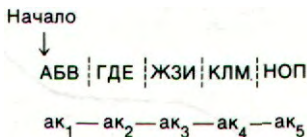
Эту дилемму удалось решить путем определения последовательности аминокислот в мутантах. Предположим, что основание В мутировало в В'. Если код не перекрывается, изменится только одна аминокислота. При полностью перекрывающемся коде мутация В в В' приведет к изменению аминокислот 1, 2 и 3. Изучение последовательности аминокислот белков оболочки мутантов вируса табачной мозаики показало, что у этих мутантов измененной обычно оказывалась только одна аминокислота. Напомним также, что как уже говорилось при обсуждении аномальных гемоглобинов в гл. 5, и в этом случае у большинства мутантов происходило изменение только одной аминокислоты. Отсюда был сделан вывод, что *генетический код не перекрывается*:



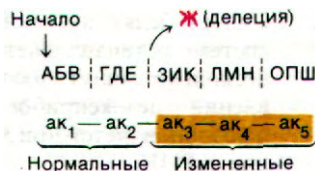
3. Как происходит правильное считывание группы из трех оснований? *A priori* одна из возможностей состоит в том, что одно из четырех оснований (оно обозначено Q) служит «запятой» между группами по три основания:

...QABVQГДЕQЖЗИQKLMQ...

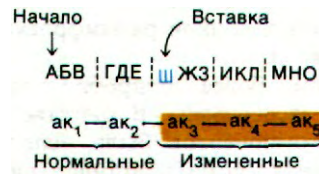
Оказалось, что это не так. *Последовательность оснований читается последовательно, начиная со строго определенной точки:*



Запятых в коде нет. Предположим, что в результате мутации произошла делеция основания Ж:



Первые две аминокислоты в этой полипептидной цепи будут нормальными, но остальная последовательность оснований будет прочитана неправильно, так как в результате делеции Ж произошел сдвиг рамки считывания. Теперь предположим, что между Е и Ж добавилось основание Ш:



Эта вставочная мутация также нарушает рамку считывания, начиная с кодона аминокислоты 3. В действительности генетические исследования вставочных и делеционных мутантов позволили выяснить многие свойства генетического кода,

4. Как уже было сказано выше, существует 64 возможных триплета оснований и 20 аминокислот. Соответствует ли каждой из 20 аминокислот только один триплет, или некоторые аминокислоты кодируются более чем одним триплетом? Генетические исследования показали, что большинство из 64 триплетов кодируют аминокислоты. В последующих биохимических исследованиях было установлено, что 61 триплет из 64 кодирует определенные аминокислоты. Таким образом, для большинства аминокислот имеется более одного кодового слова. Другими словами, генетический код вырожден.

26.3. Расшифровка генетического кода: синтетические РНК могут служить информационными РНК

Каково соотношение между 64 видами кодовых слов и 20 аминокислотами? В принципе на этот вопрос можно получить прямой ответ, если сравнить последовательность аминокислот в каком-либо белке с соответствующей последовательностью оснований его гена или мРНК. Однако в 1961 г. этот подход был совершенно недоступен, так как о последовательностях оснований в генах и молекулах мРНК ничего не было известно. Тогда казалось, что проблема генетического кода не может быть решена в близком будущем, но внезапно ситуация изменилась. Маршалл Ни-

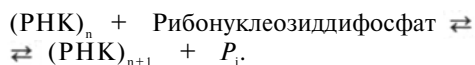
26. Генетический код. Зависимость гены-белки

ренберг (Marshall Nirenberg) обнаружил, что добавление полиуридилата [*poly(U)*] в бесклеточную систему синтеза белка приводит к синтезу полифенилаланина. Очевидно, *poly(U)* выполнил функцию информационной РНК. Первое кодовое слово было расшифровано: UUU кодирует фенилаланин. Этот замечательный эксперимент указал путь к полной расшифровке генетического кода.

Обсудим более подробно этот эпохальный эксперимент. В качестве двух основных компонентов были использованы бесклеточная система, активно синтезировавшая белок, и синтетический полирибонуклеотид, сыгравший роль информационной РНК. Бесклеточная система синтеза белка была получена из *E. coli* следующим образом. Бактериальные клетки осторожно разрушали, перемалывая с тонко измельченным порошком окиси алюминия, чтобы получить клеточный сок. Затем обрывки клеточной стенки и клеточной мембраны удаляли центрифугированием. В результате получали экстракт, содержащий ДНК, мРНК, тРНК, рибосомы, ферменты и другие клеточные компоненты. При добавлении АТР, ГТР и аминокислот в этой бесклеточной системе синтезировался белок. По крайней мере одна из добавленных аминокислот была радиоактивной, что давало возможность обнаружить ее включение в белок. Эту смесь инкубировали при 37°C примерно в течение 1 ч. Затем добавляли трихлоруксусную кислоту, чтобы остановить реакцию и осадить белки. При этом свободные аминокислоты оставались в надосадочной фракции. Осадок промывали и просчитывали его радиоактивность, определяя таким образом сколько меченой аминокислоты включилось в новосинтезированный белок. Важная особенность этой системы состоит в том, что синтез белка можно остановить добавлением дезоксирибонуклеазы, разрушающей матрицы для синтеза новых мРНК. Поскольку та мРНК, которая уже имелась в смеси ко времени добавления дезоксирибонуклеазы, лабильна, синтез белка можно прекратить в течение нескольких минут. Затем Ниренберг обнаружил, что синтез белка возобновляется при добавлении неочищенной фракции мРНК. Таким образом, в руках

Ниренберга была бесклеточная система синтеза белка, зависящая от добавления мРНК.

Другим важнейшим компонентом в этом эксперименте был синтетический полирибонуклеотид *poly(U)*. *Poly(U)* синтезировали с помощью полинуклеотид-фосфорилазы-фермента, открытого в 1955 г. Марианной Грюнберг-Манаго и Северо Очоа (Marianne Grunberg-Manago, Severo Ochoa). Этот фермент катализирует синтез полирибонуклеотидов из рибонуклеозиддифосфатов:



Полинуклеотид-фосфорилаза и РНК-полимераза катализируют совершенно различные реакции. В приведенной реакции активированными предшественниками служат рибонуклеозиддифосфаты, а не трифосфаты. Продукт реакции - ортофосфат, а не пирогосфат. Следовательно, равновесие в реакции не может быть смещено вправо в результате гидролиза пирогосфата. В самом деле, *in vivo* равновесие смещено в сторону распада РНК, а не ее синтеза. Принципиальное отличие состоит в том, что полинуклеотид-фосфорилаза не использует матрицы. Состав РНК, синтезированной этим ферментом, определяется соотношением рибонуклеотидов в инкубационной смеси, а последовательность близка к случайной. Благодаря этому полинуклеотид-фосфорилаза оказалась ценнейшим инструментом в экспериментах по расшифровке генетического кода. Например, *poly(U)* синтезировали, инкубируя в присутствии фермента раствор высокой



Рис. 26.3. Синтез белка в бесклеточной системе останавливается через несколько минут после добавления дезоксирибонуклеазы и возобновляется при добавлении мРНК.

концентрации UDP. Сополимеры двух рибонуклеотидов, например U и A, со случайной последовательностью готовили, также инкубируя UDP и ATP с этим ферментом.

Различные синтетические рибонуклеотиды вводили в бесклеточную систему синтеза белка и измеряли включение меченного ¹⁴C L-фенилаланина. Результаты оказались поразительными:

Добавленный полинуклеотид	¹⁴ C, имп./мин
Контроль	44
Poly(A)	50
Poly(C)	38
Poly(U)	39800

Тот же эксперимент был проделан с различными ¹⁴C-аминокислотами в каждой инкубационной смеси. Оказалось, что *poly(A)* вызывает синтез полилизина, а *poly(C)* - синтез полипролина. Так было расшифровано три кодовых слова:

Кодовое слово	Аминокислота
UUU	Фенилаланин
AAA	Лизин
CCC	Пролин

Кодовое слово GGG невозможно было расшифровать таким же образом, потому что *poly(G)* не работает в качестве матрицы. Возможно, это объясняется тем, что он образует трехцепочечную спиральную структуру. Полирибонуклеотиды, образующие протяженные участки с упорядоченной структурой, не эффективны в качестве матриц для синтеза белка.

26.4. Состав кодонов многих аминокислот был определен с помощью сополимеров в качестве матриц

Для дальнейшего изучения генетического кода были использованы в качестве матриц полирибонуклеотиды, состоящие из оснований двух типов. Например, случайный сополимер U и G содержит восемь

Таблица 26.1. Ожидаемая встречаемость триплетов в случайном сополимере U (0,76) и G (0,24)

Триплет	Вероятность	Относительная встречаемость, %
UUU	$0,76 \cdot 0,76 \cdot 0,76 = 0,439$	100
UUG	$0,75 \cdot 0,24 \cdot 0,24 = 0,139$	31,6
UGU	$0,76 \cdot 0,24 \cdot 0,76 = 0,139$	31,6
GUU	$0,24 \cdot 0,76 \cdot 0,76 = 0,139$	31,6
UGG	$0,76 \cdot 0,24 \cdot 0,24 = 0,0438$	10,0
GUG	$0,24 \cdot 0,76 \cdot 0,24 = 0,0438$	10,0
GGU	$0,24 \cdot 0,24 \cdot 0,76 = 0,0438$	10,0
GGG	$0,24 \cdot 0,24 \cdot 0,24 = 0,0138$	3,1

различных триплетов: UUU, UUG, UGU, GUU, UGG, GUG, GGU и GGG. Относительную частоту этих триплетов можно легко вычислить, исходя из молярного соотношения U и G в сополимере. Оно составляло 0,76:0,24 (табл. 26.1). Относительное включение различных аминокислот в присутствии этой матрицы приведено в табл. 26.2. В наибольшей степени включался, как и можно было предполагать, фенилаланин, так как триплет UUU встречался чаще всего. Затем шли валин, лейцин и цистеин. Уровень их включения составлял чуть больше трети от включения фенилаланина, что соответствует вычисленной частоте встречаемости триплетов, содержащих два U и одно G. Включение других аминокислот было очень низким. Отсюда был сделан вывод, что *валин, лейцин и цистеин кодируются кодами, содер-*

Таблица 26.2. Включение аминокислот в присутствии случайного сополимера U (0,76) и G (0,24)

Аминокислота	Относительное включение, %	Состав соответствующего кодона
Фенилаланин	100	UUU
Валин	37	2U, 1G
Лейцин	36	2U, 1G
Цистеин	35	2U, 1G
Триптофан	14	1U, 2G
Глицин	12	1U, 2G

26. Генетический код. Зависимость гены-белки

жащими 2U и 1G, а триптофан и глицин кодируются кодонами, которые содержат 1U и 2G.

Эксперименты того же типа проводили и с другими случайными сополимерами, а именно с UA, UC, AC и AG, а также с UGC, AGC, UAC и UAG. Таким образом в лабораториях Ниренберга и Очоа был определен *состав* кодонов, соответствующих каждой из 20 аминокислот.

26.5. Тринуклеотиды способствуют связыванию определенных молекул тРНК с рибосомами

При использовании смешанных сополимеров в качестве матриц удалось установить *состав кодонов*, соответствующих определенным аминокислотам, *но не их последовательность* (кроме UUU, AAA и CCC). Как уже говорилось, валин кодируется триплетом из 2U и 1G. Какой же это триплет: UUG, UGU или GUU? Ответ на этот вопрос был получен с помощью двух совершенно различных экспериментальных подходов: во-первых, с использованием синтетических полирибонуклеотидов с упорядоченной последовательностью и, во-вторых, с помощью зависящего от кодона специфического связывания молекул тРНК с рибосомами.

В 1964 г. Ниренберг установил, что *три-нуклеотиды способствуют связыванию определенных молекул тРНК с рибосомами в отсутствие синтеза белка*. Например, добавление pUpUpU вызывает связывание фенилаланиновой тРНК, а pArArA значительно увеличивает связывание лизиновой тРНК, как и pCpCpC-связывание пролиновой тРНК. Динуклеотиды не стимулируют связывания тРНК с рибосомами. Эти работы показали, что *тринуклеотид (как и триплет в мРНК) специфически связывается с определенной молекулой тРНК, для которой он является кодовым словом*. Был разработан простой и быстрый тест на связывание: связанные с рибосомами молекулы тРНК задерживаются на нитроцеллюлозном фильтре, а несвязанные молекулы тРНК проходят через фильтр. Для того чтобы определить, какие именно молекулы тРНК садятся на фильтр, использовали молекулы тРНК, несущие определенную аминокислоту, меченную ^{14}C .

С помощью методов органической химии и биохимии были синтезированы все 64 тринуклеотида. Для каждого тринуклеотида было проверено связывание молекул тРНК, соответствующих всем 20 аминокислотам. Например, было показано, что pUpUpG стимулирует связывание только лейциновой тРНК, pUpGpU - только цистеиновой тРНК, а pGpUpU - связывание только валиновой тРНК. Отсюда был сделан вывод, что кодоны UUG, UGU и GUU соответствуют лейцину, цистеину и валину соответственно. С несколькими кодонами не было получено избирательного связывания какой-либо тРНК, тогда как с несколькими другими связывалось более одной тРНК. Для большинства кодонов были получены вполне четкие результаты. В общем этот простой и элегантный подход позволил расшифровать около 50 кодонов.

26.6. Еще один инструмент расшифровки кода - сополимеры с определенной последовательностью

Примерно в то же время Гобинду Коране (Gobind Khorana) удалось синтезировать полирибонуклеотиды с определенной повторяющейся последовательностью. Сочетая методы органической химии и ферментативные методы, он синтезировал ряд сополимеров с повторяющейся последовательностью из двух, трех и четырех оснований. Рассмотрим, к примеру, стратегию синтеза poly(GUA). Этот упорядоченный сополимер имеет последовательность

GUAGUAGUAGUAGUAGUAGUA...

Прежде всего Корана синтезировал с помощью методов органической химии два комплементарных дезоксирибонуклеотида по девять нуклеотидов длиной: d(TAC)₃ и d(GTA)₃. Затем эти два олигонуклеотида были использованы в качестве матрицы для синтеза длинных цепей ДНК из четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов под действием ДНК-полимеразы I. Ни один олигонуклеотид в отдельности не был эффективной матрицей. Если же присутствовали оба олигонуклеотида, то d(TAC)₃ служил матрицей для синтеза poly(dGTA), а d(GTA)₃ - для синтеза poly(dTAC). Эти длинные комплементарные ДНК образовывали двухспиральные молекулы. Следующим шагом было получение длинных

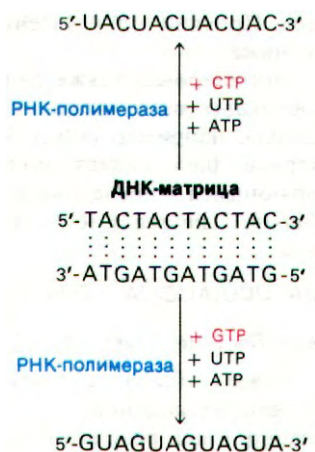


Рис. 26.4. Цепь этой двухспиральной матричной ДНК, которая должна транскрибироваться, определяется набором рибонуклеозидтрифосфатов в инкубационной смеси.

полирибонуклеотидных цепей с последовательностью, соответствующей poly(dTAC) и poly(dGTA). Для этого дуплекс poly(dTAC): poly(dGTA) использовали в качестве матрицы для РНК-полимеразы. Цепь ДНК для транскрипции можно выбрать, добавляя три подходящих рибонуклеозидтрифосфата. Если в инкубационную смесь добавить GTP, UTP и ATP, то на матричной цепи poly(dTAC) синтезируется полирибонуклеотидный продукт poly(GUA). Другая цепь не транскрибируется, так как не хватает одного из необходимых субстратов - CTP. Если же добавить CTP, UTP и ATP, то на другой матричной цепи синтезируется poly(UAC). Итак, *органический синтез и вслед за ним матричный синтез с помощью ДНК-полимеразы и РНК-полимеразы позволили синтезировать два длинных полирибонуклеотида со строго определенной повторяющейся последовательностью оснований* (рис. 26.4).

Эти регулярные сополимеры были использованы в качестве матриц в бесклеточной системе синтеза белка. Рассмотрим некоторые результаты такого эксперимента. Сополимер, состоящий из чередующейся последовательности двух оснований - А и Б:

АБА | БАБ | АБА | БАБ | АБА | . . .

содержит кодоны двух видов - АБА и БАБ. Поэтому полипептидный продукт должен представлять собой чередующуюся последовательность из двух аминокислот (сокращенно обозначенных $ак_1$ и $ак_2$):

$ак_1 - ак_2 - ак_1 - ак_2 - ак_1 -$

Стоит ли на N-конце полипептидного продукта $ак_1$ или $ак_2$, зависит от того, начинается ли рамка считывания с А или с Б. Если в качестве матрицы использовали poly(UG), то синтезировался полипептид из чередующихся валина (Val) и цистеина (Cys):

UGU|GUG|UGU|GUG|UGU|GUG

Cys—Val—Cys—Val—Cys—Val

Этот результат однозначно доказывал триплетность кода и показывал, что один из триплетов - UGU или GUG - кодирует цистеин, а другой - валин. В сочетании с данными по связыванию тРНК было очевидно, что UGU кодирует цистеин, а GUG - валин. В присутствии некоторых чередующихся сополимеров из двух оснований происходил синтез следующих полипептидов:

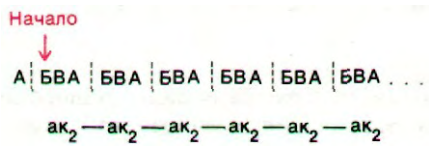
Матрица	Продукт	Смысл кодонов
Poly(UC)	Poly(Ser-Leu)	UCU → Ser CUC → Leu
Poly(AG)	Poly(Arg-Gln)	AGA → Arg GAG → Gln
Poly(AC)	Poly(Thr-His)	ACA → Thr CAC → His

Рассмотрим теперь матрицу, состоящую из повторяющейся последовательности трех оснований, поли(АБВ). Если рамка считывания начинается с А, образующийся полипептид должен содержать аминокислоту только одного вида, кодируемую триплетом АБВ:

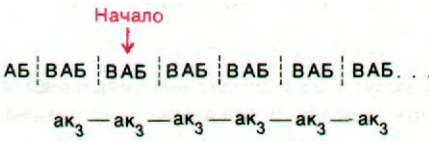
Начало
↓
АБВ | АБВ | АБВ | АБВ | АБВ | АБВ . . .
 $ак_1 - ак_1 - ак_1 - ак_1 - ак_1 - ак_1$

26. Генетический код. Зависимость гены-белки

Если рамка считывания начинается с Б, синтезирующийся полипептид должен содержать другую аминокислоту, кодируемую триплетом БВА:



Если же рамка считывания начинается с В, должен образовываться полипептид третьего типа, содержащий аминокислоту, кодируемую триплетом ВАБ:



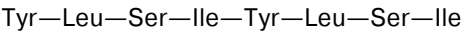
Таким образом, предполагаемые продукты - три различных гомополипептида. Действительно, именно такой результат получался в случае большинства матриц, состоящий из повторяющейся последовательности трех нуклеотидов. Например, на poly(UUC) синтезировались полифенилаланин, полисерин и полилейцин. Этот результат в сочетании с результатами других экспериментов показывал, что UUC кодирует фенилаланин, UCU-серин и CUU-лейцин. Полипептиды, которые синтезировались на других матрицах этого типа, приведены в табл. 26.3. Обратите внимание, что в присутствии poly(GUA) и poly(GAU) происходил синтез двух, а не трех гомопо-

Таблица 26.3. Гомополипептиды, синтезирующиеся на матрицах, которые состоят из повторяющихся последовательностей тринуклеотидов

Матрица	Синтезирующиеся полипептиды
Poly(UUC)	Phe; Ser; Leu
Poly(AAG)	Lys; Glu; Arg
Poly(UUG)	Cys; Leu; Val
Poly(CCA)	Gln; Thr; Asn
Poly(GUA)	Val; Ser
Poly(UAC)	Tyr; Thr; Leu
Poly(AUC)	Ile; Ser; His
Poly(GAU)	Met; Asp

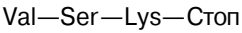
липептидов. Причина этого явления станет ясна чуть ниже.

Корана синтезировал также ряд сополимеров, состоящих из повторяющегося трануклеотида, например poly(UAUC). На этой матрице шел синтез полипептида с повторяющейся последовательностью Tyr-Leu-Ser-Ile независимо от рамки считывания:

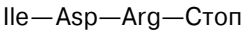


Отсюда можно было сделать вывод о смысле четырех кодонов.

Совершенно иной результат был получен при использовании в качестве матрицы poly(GUAA). Единственными продуктами были ди- и трипептиды. Почему не было более длинных цепей? Объясняется это тем, что один из триплетов, встречающихся в этом сополимере, а именно UAA, кодирует не аминокислоту, а терминацию синтеза белка:



На матрице poly(AUAG) также получались только ди- и трипептиды, так как UAG-второй сигнал терминации цепи:



Посмотрим теперь снова на табл. 26.3. На матрице poly(GUA) синтезировались два, а не три гомополипептида по той причине, что третья рамка считывания соответствует последовательности



т. е. представляет собой повторяющуюся последовательность сигнала терминации. Как же обстоит дело с poly(GAU)? На этой матрице синтезировались только два гомополипептида, потому что третья рамка считывания соответствует еще одному сигналу терминации - UGA:



Таблица 26.4. **Генетический код**¹⁾

Первое положение (5'-конец)	Второе положение				Третье положение (3'-конец)
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Стоп	Стоп	A
	Leu	Ser	Стоп	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Me	Thr	Asn	Ser	C
	Me	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

¹⁾ Зная положение оснований в кодоне, можно найти соответствующую аминокислоту. Например, кодон 5'-AUG-3' в мРНК детерминирует метионин, тогда как CAU детерминирует гистидин. Кодоны UAA, UAG и UGA - сигналы терминации (стоп-кодоны). AUG является частью сигнала инициации помимо того, что он кодирует внутренние остатки метионина.

В действительности оказалось, что *только три кодона не кодируют никакой аминокислоты: UAG, UAA и UGA.*

Синтез полинуклеотидов с определенной последовательностью в лаборатории Кораны был выдающимся достижением. Использование этих полимеров в качестве матриц для синтеза белка в сочетании с работами Ниренберга по связыванию тРНК с рибосомами в присутствии триплетов привели к полной расшифровке генетического кода к 1966 г. Еще за шесть лет до этого такое событие казалось несбыточной мечтой. Благодаря разработке совершенных методов синтеза в лаборатории Кораны стало возможным и еще одно достижение: полный синтез молекулы ДНК, соответствующей последовательности молекулы транспортной РНК.

26.7. Основные свойства генетического кода

Были расшифрованы все 64 кодона (табл. 26.4). 61 триплет соответствует определенным аминокислотам, а три кодируют терминацию. Поскольку существует 20 аминокислот и 61 триплет для их кодирования, очевидно, что код в высокой степени *вырожден*. Иными словами, *многие аминокислоты детерминируются более чем одним триплетом.* Только триптофан и метионин кодируются всего одним триплетом. Остальные 18 аминокислот кодируются двумя и более триплетами. Так, в частности, лейцин, аргинин и серин кодируются шестью кодонами каждый. В нормальных физиологических условиях код *однозначен*: каждый кодон обозначает только одну аминокислоту.

**26. Генетический код.
Зависимость гены-белки**

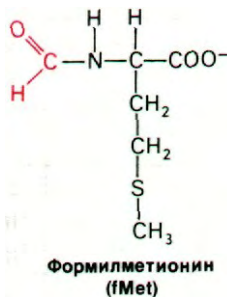
Кодоны, соответствующие одной аминокислоте, называют *синонимами*. Например, CAU и CAC - синонимы для гистидина. Обратите внимание, что синонимы не разбросаны случайным образом по таблице генетического кода (табл. 26.4). Аминокислота, кодируемая двумя или более синонимами, занимает одну клетку в таблице (за исключением тех случаев, когда для данной аминокислоты существует более четырех синонимов). Аминокислоты, расположенные в одной клетке, кодируются кодонами, у которых два первых основания одинаковые, а третье различается, например GUU, GUC, GUA и GUG. *Большинство синонимов различается только последним основанием триплета*. Рассмотрение кода показывает, что ХУС и ХУУ всегда кодируют одну и ту же аминокислоту, а ХУГ и ХУА чаще (но не всегда) кодируют одну и ту же аминокислоту. Структурные основы такой эквивалентности кодонов станут понятны после обсуждения природы антикодонов в молекулах тРНК (разд. 27.6).

Каков биологический смысл сильной вырожденности генетического кода? Один из возможных ответов состоит в том, что *вырожденность сводит к минимуму пагубное действие мутаций*. Если бы код не был вырожден, 20 кодонов кодировали бы аминокислоты, а 44 вызывали бы терминацию цепи.

Таким образом, вероятность превращения кодона в сигнал терминации была бы гораздо выше в случае невырожденного кода, чем в существующем коде. Важно учесть, что мутации, приводящие к образованию сигнала терминации цепи, обычно приводят к синтезу неактивных белков, тогда как замещение одной аминокислоты другой обычно относительно безвредно. Кроме того, *вырожденность кода может иметь определенное значение постольку, поскольку она позволяет нуклеотидному составу ДНК меняться в широких пределах, не влияя на аминокислотную последовательность белков, кодируемых этой ДНК*, $([G] + [C])$ -содержание бактериальных ДНК колеблется от 30% до более 70%. Молекулы ДНК с сильно различающимся содержанием $[G] + [C]$ могут кодировать одни и те же белки благодаря систематическому использованию различных синонимов.

26.8. Сигналы инициации и терминации синтеза белка

Как мы уже упоминали, UAA, UAG и UGA (*стоп-кодона*ми) обозначают терминацию цепи. Эти кодоны считаются не молекулами тРНК, а особыми белками - факторами терминации. Сигнал начала (инициации) синтеза белка более сложен. Полипептидные цепи у бактерий начинаются с модифицированной аминокислоты формилметионина (fMet).



Существует особая тРНК, которая переносит fMet. Эта fMet-тРНК узнает кодон AUG (или реже GUG). Однако AUG является также кодоном для метионина, расположенного внутри полипептида, а GUG-кодон внутреннего валина. Это значит, что сигнал для первой аминокислоты полипептидной цепи должен быть сложнее, чем для всех последующих аминокислот. AUG (или GUG) представляет собой *часть сигнала инициации*. Существует другой сигнал, предшествующий AUG (или GUG), который определяет, будет ли кодон считан как сигнал инициации цепи или как кодон для внутреннего остатка метионина (или валина). Механизмы инициации и терминации синтеза белка мы рассмотрим в следующей главе (разд. 27.13).

26.9. Генетический код универсален

Как мы уже сказали, генетический код был расшифрован в результате исследований поведения триплектоидов и синтетических матричных РНК в бесклеточных системах, полученных из бактерий. Возникают два вопроса. Одинаков ли генетический код *in vivo* и *in vitro*? Одинаков ли генетический код у всех организмов? Убедительный ответ на эти вопросы был получен при анализе мутаций у вирусов, бактерий и высших организмов. Известно множество аминокислотных замен, возникающих в результате мутаций в генах гемоглобина человека, белка обо-

лочки вируса табачной мозаики (ВТМ) и α-цепи триптофан-синтазы *E.coli*. Почти все эти аминокислотные замены объясняются заменами всего лишь одного основания (табл. 26.5). Это - надежная проверка правильности всего генетического кода и его универсальности.

Почему код не изменился за миллионы лет эволюции? Обсудим действие мутации, изменяющей считывание мРНК. Такая мутация изменит последовательность аминокислот в большинстве, если не во всех белках, синтезируемых в клетках мутантного организма. Многие из этих изменений, безусловно, окажутся губительными, и, следовательно, должно существовать сильное давление отбора против таких мутаций.

26.10. Последовательность оснований гена и последовательность аминокислот соответствующего полипептида коллинеарны

Обратимся теперь к взаимоотношениям между генами и белками. Как показала работа Сеймура Бензера (Seymour Benzer) по генетическому картированию высокого разрешения, гены - неразветвленные структуры. Этот важный результат согласовывался с установленным фактом, что ДНК представляет собой линейную последовательность пар оснований. Полипептидные цепи также имеют неразветвленную структуру. Поэтому в начале 60-х годов возник следующий вопрос: *существует ли линейное соответствие между геном и его полипептидным продуктом?*

Подход Чарлза Янофски (Charles Yanofsky) к этой проблеме состоял в использовании мутантов *E.coli*, у которых образуется измененная молекула фермента. Было выделено много мутантов по α-цепи триптофан-синтазы и определена локализация мутаций на генетической карте α-цепи с помощью рекомбинационных экспериментов с трансдуцирующим фагом. Некоторые из этих мутаций были локализованы близко друг к другу на генетической карте, тогда как другие были сильно удалены в пределах одного гена. Следующей важной задачей было определить положение аминокислотной замены для каждого из этих десяти мутантов. Прежде всего была определена последовательность 168 аминокислот α-цепи дикого типа. Затем с помощью метода «отпечатков пальцев» были установлены место и природа аминокислотной замены в каждом случае. *Порядок расположения мута-*

ций на генетической карте был таким же, как порядок соответствующих замен в последовательности аминокислот полипептидного продукта (рис. 26.5). Другими словами, *ген, кодирующий α-цепь, и его полипептидный продукт коллинеарны.*

26.11. Некоторые последовательности вирусных ДНК кодируют более одного белка

Открытие того факта, что ДНК фага φX174 кодирует больше белков, чем позволяет имеющееся в ней количество нуклеотидов, было совершенно загадочным. Как этот вирус может кодировать более 2000 аминокислотных остатков, если он содержит всего лишь 5375 нуклеотидов? Ответ был получен из полной последовательности оснований (разд. 24.29), когда обнаружилось, что в ДНК фага φX174 некоторые *гены перекрываются*. Определенные участки соответствующих транскриптов транслируются в различных рамках считывания, что приводит к образованию белков с различными последовательностями аминокислот (рис. 26.6). Например, одни и те же 300 нуклеотидов кодируют белок гена E и большую часть белка гена D. Еще более поразительный

Таблица 26.5. Мутации в гемоглобине человека, триптофан-синтазе *E.coli* и белке оболочки вируса табачной мозаики (ВТМ)

Белок	Замена аминокислоты	Предполагаемое изменение кодона
Гемоглобин	Glu→Val ¹⁾	GAA→GUA
Гемоглобин	Glu→Lys ¹⁾	GAA →AAA
Гемоглобин	Glu→Gly	GAA→GGA
Триптофан-синтаза	Gly→Arg	GGA→AGA
Триптофан-синтаза	Gly→Glu	GGA →GAA
Триптофан-синтаза	Glu→Ala	GAA→GCA
Белок оболочки ВТМ	Leu→Phe	CUU→UUU
Белок оболочки ВТМ	Glu→Gly	GAA→GGA
Белок оболочки ВТМ	Pro→Ser	CCC→UCC

¹⁾ Замена Glu→Val и Glu→Lys происходит в положении 6 в β-цепи гемоглобинов S и C человека соответственно.

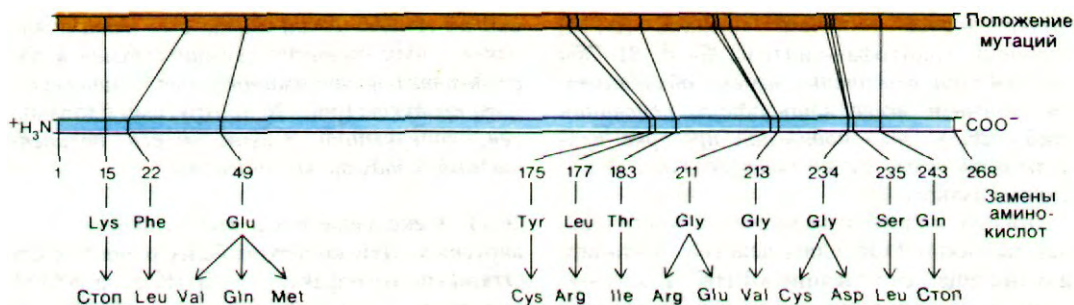


Рис. 26.5. Коллинеарность гена и аминокислотной последовательности α -цепи триптофан-синтазы. Положение мутаций в ДНК (желтая линия) было определено методами генетического картирования. Аминокислотные замены в последовательности аминокислот (синяя линия) расположены в том же порядке, что и соответствующие мутации. (Yanofsky C., Gene Structure and Protein Structure, Sci. Amer., 1967.)

26.12. Гены эукариот представляют собой мозаику из транслируемых и нетранслируемых последовательностей ДНК

У бактерий полипептидные цепи кодируются непрерывной последовательностью триплетных кодонов. В течение многих лет считалось, что гены высших организмов также непрерывны. Эта точка зрения была неожиданно опровергнута в 1977 г., когда в нескольких лабораториях было открыто, что некоторые гены имеют *прерывистое строение*. Например, ген β -цепи гемоглобина прерывается в области, кодирующей аминокислотную последовательность, длиной *некодирующей вставочной последовательности* из 550 пар оснований и короткой последовательностью из 120 пар оснований. Таким образом, ген β -глобина *разделен на три кодирующие последовательности*:

пример представляет родственный бактериофаг G4, в ДНК которого некоторые короткие участки кодируют три различных



белка. Эти вирусы используют *перекрывающиеся гены*, чтобы ввести больше информации в маленькие молекулы ДНК. Однако за эту генетическую экономию приходится платить: на последовательности аминокислот, кодируемые перекрывающимися генами, накладываются строгие ограничения. Поэтому перекрывающиеся гены, по-видимому, широко используются лишь в тех случаях, когда количество ДНК строго лимитировано, как в случае вирусов с белковой оболочкой строго определенных размеров.

Эта удивительная структура была открыта с помощью электронно-микроскопических исследований гибридов между β -глобиновой мРНК и фрагментом ДНК мыши, содержащим ген β -глобина (рис. 26.7). Двухцепочечная ДНК частично денатурируется, что позволяет мРНК гибридизоваться с комплементарной цепью ДНК. Затем одноцепочечный участок ДНК образует петлю и на электронных микрофотографиях выглядит как тонкая линия в отличие от двухцепочечной ДНК или ДНК-РНК-гибридных участков, которые выглядят значительно толще. Если бы ген β -глобина был

	C	
Leu	T	
	G	Trp
	G	
Asp	A	
	C	Thr
	T	
Phe	T	
	T	Leu
	G	
Val	T	
	G	Trp
	G	
Gly	G	
	A	Asp
	T	
Tyr	A	
	C	Thr
	C	
Pro	C	
	T	Leu
	C	
Arg	G	
	C	Ala
	T	
Phe	T	
	T	Phe
	C	

Рис. 26.6. Перекрывающиеся гены в ДНК фага φX174. Рядом с последовательностью оснований показаны две последовательности аминокислот, детерминируемые различными рамками считывания.

непрерывен, была бы видна одна петля. Однако на электронных микрофотографиях таких гибридов (рис. 26.8) отчетливо видны три петли. Это показывает, что ген прерывается по крайней мере одним участком ДНК, которого нет в соответствующей мРНК. Дополнительные данные о вставочных последовательностях были получены при картировании рестрикционных фрагментов гена β-глобина и продукта обратной транскрипции мРНК. Большие различия между этими картами показали, что геномная ДНК содержит нетранслируемые последовательности между кодирующими последовательностями. Рестрикционные карты позволили уточнить локали-

зацию таких вставочных последовательностей.

На каком этапе экспрессии гена удаляются вставочные последовательности? Новосинтезированные РНК, выделенные из ядра, значительно длиннее молекул мРНК, которые из них получаются. В частности, первичный транскрипт гена β-глобина содержит две нетранслируемые области. *Эти вставочные последовательности в первичном 15S-транскрипте вырезаются, а кодирующие последовательности одновременно соединяются под действием фермента сплайсинга. Этот фермент обладает высокой точностью. Так, образуется зрелая 9S-мРНК (рис. 26.9). Кодирующие последовательности прерывистых («разорванных») генов называются экзонами, а вставочные последовательности - интронами (от англ. слов expressed regions - экспрессирующиеся участки и intervening sequence - прерывающая последовательность).*

Еще один прерывистый эукариотический ген - ген овальбумина куриного яйца, который состоит из восьми экзонов, разделенных семью длинными интронами (рис. 26.10). Еще более удивителен ген кональбумина: он содержит не менее 17 экзонов. Общее свойство экспрессии этих генов - то, что их экзоны располагаются в мРНК и в ДНК в одной и той же последовательности. Таким образом, *прерывистые гены, подобно непрерывным генам, коллинеарны своим полипептидным продуктам.*

Все картированные до настоящего времени гены птиц и млекопитающих, кроме генов гистонов (разд. 29.13), содержат интроны. Почему практически все гены высших эукариот содержат вставочные последовательности? Один из возможных ответов состоит в том, что прерывистые гены отражают процесс эволюции. Экзоны могут соответствовать крупным структурным или функциональным элементам (доменам), которые соединились и образовали белки с новыми свойствами. Другая возможность состоит в том, что вырезание вставочных последовательностей регулирует поток мРНК из ядра в цитозоль. В соответствии с этой гипотезой сплайсинг (сращивание) первичного транскрипта играет ключевую роль: он определяет, какие белки синтезирует клетка. Открытие прерывистых генов у высших организмов ввело нас в увлекательную область

26. Генетический код. Зависимость гены-белки

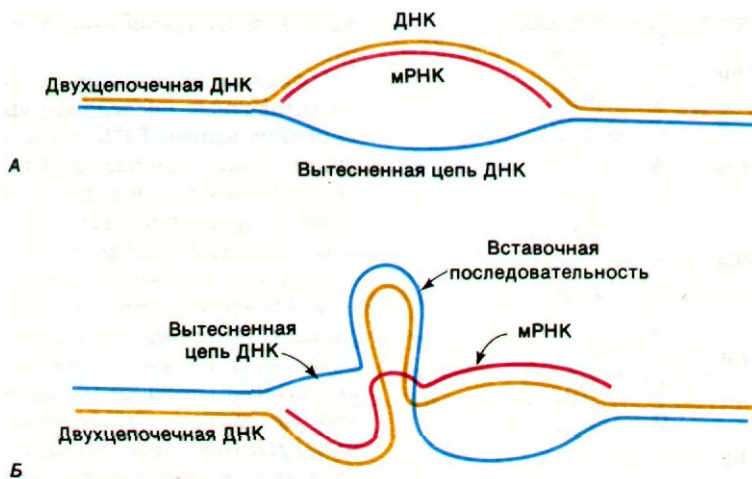


Рис. 26.7. Выявление вставочных последовательностей с помощью электронной микроскопии. Молекула мРНК (красная линия) гибридизуется с геномной ДНК, содержащей соответствующий ген. *А* - если ген непрерывен, видна одна петля одноцепочечной ДНК (показано синим цветом); *Б* - если ген содержит вставочную последовательность, видны две петли одноцепочечной ДНК (показано синим цветом) и одна петля двухцепочечной ДНК (синий и желтый цвет).

за один цикл репликации. Для *E.coli* и *Drosophila melanogaster* эти величины составляют $4 \cdot 10^{-10}$ и $7 \cdot 10^{-1}$ соответственно.

Существует два типа одиночных замен пары оснований. *Транзиция* - замещение одного пурина другим пурином или одного пиримидина другим пиримидином. *Трансверсией*, наоборот, называется замещение

познания, которая, по-видимому, имеет большое значение для понимания роста и дифференцировки клеток.

26.13. Мутации возникают в результате изменений последовательности оснований ДНК

Существуют мутации нескольких типов: 1) замена одной пары оснований (или нескольких пар) другой парой; 2) делеция одной или более пар оснований; 3) вставка (включение, инсерция) одной или более пар оснований (рис. 26.11). Наиболее распространенный тип мутаций - замена одной пары оснований другой парой. Частота спонтанных мутаций у бактериофага Т4 была оценена в $1,7 \cdot 10^{-8}$ на одну пару оснований

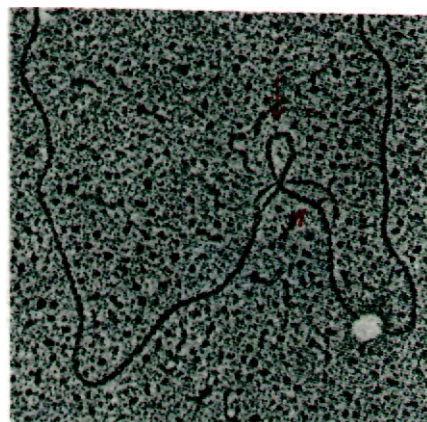


Рис. 26.8. Электронная микрофотография гибрида β -глобиновой мРНК и фрагмента геномной ДНК, содержащего ген β -глобина. Толстые петли двухспиральной ДНК - вставочные последовательности в ДНК, которых нет в мРНК (как на рис. 26.7, Б). Верхняя стрелка указывает на большую вставочную последовательность, нижняя стрелка - на маленькую. (Печатается с любезного разрешения д-ра Philip Leder.)

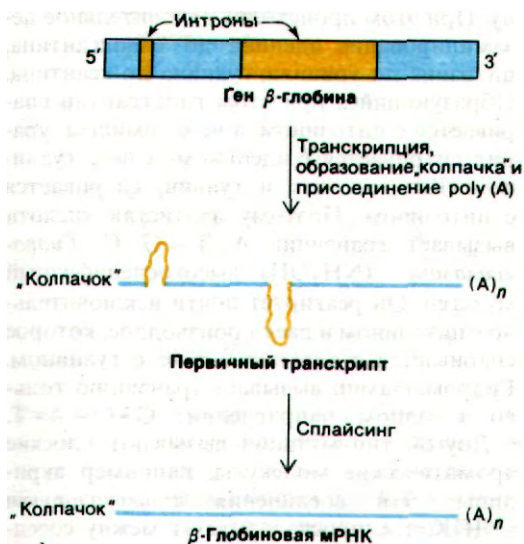
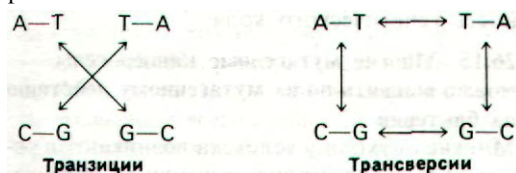


Рис. 26.9. Транскрипция гена β -глобина и удаление вставочных последовательностей из первичного РНК-транскрипта. Образование «колпачка» и присоединение poly(A) обсуждаются в разд. 29.22.

пурина пиримидином или пиримидина пурином:



Механизм спонтанного возникновения транзиций был предложен Уотсоном и Криком в их классической работе о двойной спирали ДНК. Они отметили, что некоторые атомы водорода каждого из четырех оснований могут менять свое положение. Такие таутомерные формы, которые возникают с низкой вероятностью, могут обра-

завывать необычные пары оснований, отличные от А-Т и G-С. Например, таутомерная иминоформа аденина может спариваться с цитозином (рис. 26.12). В следующем цикле репликации этот аденин, возможно, снова перейдет в свое обычное таутомерное состояние и будет спариваться с тиминном, тогда как цитозин будет спариваться с гуанином. В результате одна из дочерних молекул ДНК будет содержать пару G-С вместо пары А-Т (рис. 26.13).

Кроме того, мутации могут вызывать *дефектные ДНК-полимеразы*. Существует мутант *E.coli*, у которого частота мутаций в 1000 раз выше, чем в норме, возможна, из-за измененной полимеразы. Отличительная особенность мутаций этих клеток состоит в том, что почти все они являются трансверсиями А-Т→G-С.

26.14. Некоторые химические мутагены весьма специфичны

В ДНК можно включить *аналоги оснований*, например 5-бромурацил и 2-аминопурин. Они вызывают транзиции, нарушая правила спаривания оснований в процессе их собственного включения в состав ДНК или в следующем цикле репликации (рис. 26.14). Аналог тимина 5-бромурацил в норме спаривается с аденином. Однако доля енольного таутомера в 5-бромурациле выше, чем в тимине, возможно, из-за высокой электроотрицательности атома брома по сравнению с метильной группой при C-5. Енольная форма 5-бромурацила спаривается с гуанином, и это вызывает транзиции А-Т→G-С. 2-аминопурин в норме спаривается с тиминном. В отличие от аденина обычный таутомер 2-аминопурина может образовать одну водородную связь с цитозином. Поэтому 2-аминопурин способен вызывать транзиции А-Т→G-С.

В основе действия других мутагенов лежат химические модификации оснований ДНК. Например, азотистая кислота реагирует с основаниями, имеющими аминогруп-



Рис. 26.10. Структура гена овальбумина куриного яйца. Интроны (некодирующие участки) показаны желтым цветом, а экзоны - синим.

- На примере типографских ошибок
Замена
- На примере типографских ошибок
Вставка
- На примере типографских ошибок
Делеция
- На примере типограф-савдкмьэм
Нонсенс

Рис. 26.11. На примере типографских ошибок можно проиллюстрировать различные типы мутаций.



Рис. 26.12. Редкая таутомерная форма аденина спаривается с цитозином вместо тимина. Этот таутомер образуется при сдвиге протона 6-аминогруппы к атому N-1.

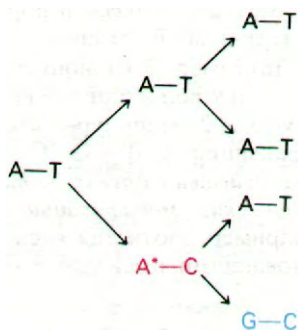


Рис. 26.13. Спаривание редкой таутомерной формы аденина (A*) с цитозином (C) приводит к появлению пары G—C в следующем поколении.

пу. При этом происходит окислительное дезаминирование аденина до гипоксантина, цитозина до урацила, гуанина до ксантина. Образующийся при этом гипоксантин спаривается с цитозином, а не с тиминном, урацил спаривается с аденином, а не с гуанином. Ксантин, как и гуанин, спаривается с цитозином. Поэтому азотистая кислота вызывает транзиции А-Т—>G-С. *Гидроксиламин* (NH₂OH) - высокоспецифичный мутаген. Он реагирует почти исключительно с цитозином и дает производное, которое спаривается с аденином, а не с гуанином. Гидроксиламин вызывает транзицию только в одном направлении: G-С—>А-Т.

Другой тип мутаций вызывают плоские ароматические молекулы, например акридины. Эти соединения *интеркалируют* в ДНК, т.е. проскальзывают между соседними парами оснований в двойной спирали ДНК (разд. 25.18). Интеркаляторы, видимо, стабилизируют спаривание оснований со сдвигом в повторяющихся последовательностях, таких, например, как CGCGCGCG. В результате они вызывают включения или делеции одной или более пар оснований. Действие таких мутаций заключается в изменении рамки считывания, если только общее число делетированных или включившихся оснований не кратно трем. Именно анализ таких мутантов позволил доказать триплетность генетического кода.

26.15. Многие мутагенные канцерогены можно выявить по их мутагенному действию на бактерии

Многие опухоли у человека возникают в результате воздействия токсичных химических веществ. Поскольку эти химические канцерогены обычно мутагенны, можно думать, что *повреждение ДНК лежит в основе и канцерогенеза, и мутагенеза*. Эти соединения важно идентифицировать и оценить их потенциальную биологическую активность, чтобы свести к минимуму то воздействие, которое они оказывают на человека. Брюс Эймс (Bruce Ames) разработал простой и чувствительный тест для выявления химических мутагенов. На чашку Петри помещают тонкий слой агара, содержащий около 10⁹ клеток специально сконструированного тест-штамма *Salmonella*. Эти бактерии не способны расти в отсутствие гистидина, поскольку они несут мутацию в одном из генов биосинтеза этой аминокислоты. Добавление мутагена в центр чашки индуцирует появление множества новых мута-

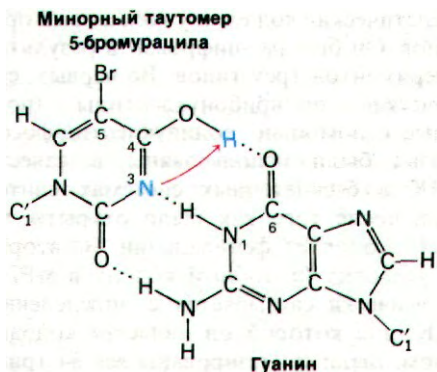


Рис. 26.14. Аналог тимина 5-бромурацил иногда спаривается с гуанином вместо аденина. Присутствие атома брома при C-5 увеличивает долю редкого таутомера, образующегося при сдвиге протона от N-3 к атому кислорода при C-4.

ций. Небольшая часть этих мутаций приводит к реверсии исходной мутации (возврат к дикому типу), так что клетки приобретают способность синтезировать гистидин. Эти *ревертанты* размножаются в отсутствие экзогенного гистидина и появляются в виде отдельных колоний на чашке после инкубации чашки в течение двух дней при 37°C (рис. 26.15). Например, 0,5 мкг 2-аминоантрацена дают 11.000 колоний ревертантов по сравнению всего лишь с 30 спонтанными ревертантами в отсутствие этого мутагена. Можно легко поставить опыт с различными концентрациями исследуемого соединения, чтобы получить кривую доза-ответ. Обычно эта зависимость имеет линейный характер; отсюда следует, что пороговой концентрации в процессах мутагенеза нет.

Некоторые тест-линии чувствительны к *заменам пар оснований*, тогда как другие можно использовать для выявления *делеций или вставок пар оснований (сдвигов рамки)*. Чувствительность этих штаммов, сконструированных специально для оценки мутагенов, увеличена генетически: они лишены системы эксцизионной репарации. Кроме того, у них нет липополисахаридной оболочки, которая обычно окружает клетки *Salmonella*. Отсутствие этого барьера облегчает проникновение в клетку потенциальных мутагенов. Еще одна важная особенность этой системы выявления мутаге-

нов - добавление *гомогената печени млекопитающих*. Напомним, что некоторые потенциальные канцерогены превращаются в активную форму под действием ферментативных систем печени или других тканей млекопитающих (разд. 20.21). В бактериях эти ферменты отсутствуют, в связи с чем на чашку наносят несколько миллиграммов го-могената печени, чтобы активировать подобные мутагены. Например, соединение

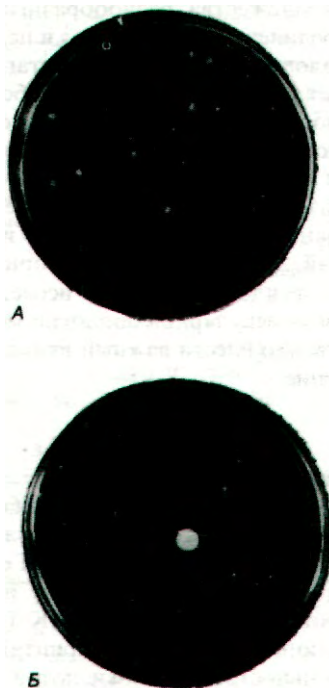


Рис. 26.15. Тест на мутагены с использованием сальмонеллы. *А.* На чашку Петри посеяно примерно 10^9 бактерий, неспособных синтезировать гистидин. *Б.* На чашку помещен кружок фильтровальной бумаги, пропитанный мутагеном. В результате возникает множество ревертантов, способных синтезировать гистидин. Эти ревертанты видны в виде ореола колоний вокруг белого кружочка. Небольшое число колоний на чашке *А* - спонтанные ревертанты. [Ames B.N., McCann J., Yamasaki E., *Mutation Res.*, 31, 347 (1975).]

с реакционноспособной боковой цепью (дающее ему возможность образовать ковалентную связь с ДНК) и с ароматической группой (которое позволяет ему интеркалировать) обладает значительно большей мутагенностью, чем такое же соединение, состоящее из одной ароматической группы.

В настоящее время тест с использованием *Salmonella* широко используется для оценки опасности мутагенного и канцерогенного действия множества разнообразных химических соединений. Эта быстрая и недорогая бактериологическая проба на мутагенность дополняет эпидемиологические обследования и пробы на животных, которые всегда оказываются более трудоемкими, медленными и дорогими. Тест на мутагенность с использованием *Salmonella* - ответвление исследований взаимосвязи гена и белка у бактерий. Это - удивительный пример того, как фундаментальные исследования в области молекулярной биологии могут непосредственно внести важный вклад в здравоохранение.

Заключение

Последовательность оснований гена коллинеарна аминокислотной последовательности полипептидного продукта. Генетический код - это взаимосвязь между последовательностью оснований в ДНК (или соответствующего РНК-транскрипта) и последовательностью аминокислот в белках. Аминокислоты кодируются группами по три основания (они называются кодонами), начиная с фиксированной точки. 61 кодон из 64 кодирует определенную аминокислоту, а остальные три кодона (UAA, UAG и UGA) служат сигналами терминации. Таким образом, для большинства аминокислот имеется более одного кодового слова. Другими словами, код вырожден. Кодоны, определяющие одну и ту же аминокислоту, называются синонимами. В большинстве случаев синонимы различаются только последним основанием триплета. Некоторые последовательности вирусных ДНК кодируют более одного белка, так как их транскрипты транслируются в различных рамках считывания.

Генетический код един у всех живых организмов. Он был расшифрован в результате экспериментов трех типов. Во-первых, синтетические полирибонуклеотиды (полученные с помощью полинуклеотид-фосфоорилазы) были использованы в качестве мРНК в бесклеточных системах синтеза белка, после того как было открыто, что poly(U) кодирует фенилаланин. Во-вторых, тринуклеотид (подобный кодону в мРНК) специфически связывается с определенной тРНК, для которой он является кодовым словом. Были синтезированы все 64 тринуклеотиды и проверена их способность стимулировать связывание определенных тРНК с рибосомами. В-третьих, в качестве мРНК были использованы синтетические полирибонуклеотиды с известной последовательностью. Например, на матрице poly(UAUC) синтезировался poly(Тур-Leu-Ser-Ile).

Многие гены высших эукариот имеют «разорванное» строение. Кодирующие последовательности (экзоны) в таких генах разделены вставочными последовательностями (интронами), которые удаляются в ходе превращения первичного транскрипта в мРНК. Например, ген β -глобина млекопитающих содержит два интрона. Прерывистые гены, как и непрерывные гены, коллинеарны своим полипептидным продуктам.

Мутации обусловлены изменениями в последовательности оснований ДНК. Основные типы мутаций - замены, делеции и включения. Самый распространенный тип мутаций - замена одной пары оснований на другую. Замена одного пурина другим или одного пиримидина другим пиримидином называется транзицией. Трансверсия - замещение пурина пиримидином и наоборот. Мутации могут возникать вследствие спонтанной таутомеризации оснований или под действием аналогов оснований (например, 5-бромурацила) или других химических мутагенов (например, азотистой кислоты). Потенциальную канцерогенную активность многих веществ можно выявить по их мутагенному действию на бактерии.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Yanofsky C., 1967. Gene structure and protein structure, *Sci. Amer.*, **216**(5), 80-94. (Статья содержит данные, свидетельствующие о коллинеарности гена и пептида.)

Nirenberg M.W., 1963. The genetic code II. *Sci. Amer.*, **208**(3), 80-94. (Описано использование синтетических полирибонуклеотидов для расширения кода.)

Crick F.H.C., 1966. The genetic code III, *Sci. Amer.*, **215**(4), 55-62. (В статье рассматриваются представления о генетическом коде в тот момент, когда он был почти полностью расшифрован.)

Kourilsky P., Chambon P., 1978. The ovalbumin gene: an amazing gene in eight pieces, *Trends Biochem. Sci.*, **3**, 244-247.

Гипотеза адаптера (роль тРНК)

Crick F.H.C., 1958. On protein synthesis, *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **12**, 138-163. (Блистательное предвидение механизма белкового синтеза. Изложена гипотеза адаптера.)

Генетический код

Crick F.H.C., Barnett L., Brenner S., Watts-Tobin R.J., 1961. General nature of the genetic code for proteins, *Nature*, **192**, 1227-1232.

Khorana H.G., 1968. Nucleic acid synthesis in the study of the genetic code. In: *Nobel Lectures: Physiology or*

Medicine (1963-1970), pp. 341-369, American Elsevier (1973).

Nirenberg M., 1968. The genetic code. In: *Nobel Lectures: Physiology or Medicine* (1963-1970), pp. 372-395, American Elsevier (1973).

Garen A., 1968. Sense and nonsense in the genetic code, *Science*, **160**, 149-159.

Woese C.K., 1967. The Genetic Code, Harper and Row.

Cold Spring Harbor Laboratory, 1966. The Genetic Code (Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, vol. 31). (Сборник выдающихся статей, в которых установлены основные свойства кода.)

Перекрывающиеся гены

Barrell B.C., Air G.M., Hutchinson C.A., III, 1976. Overlapping genes in bacteriophage ϕ X174, *Nature*, **264**, 34-40.

Коллинеарность гена и белка

Yanofsky C., Carlton B.C., Guest J.R., Helinski D.R., Henning U., 1964. On the colinearity of gene structure and protein structure, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **51**, 266-272.

Sarabhai X.S., Stretton O.W., Brenner S., Bolle A., 1964. Colinearity of gene with polypeptide chain, *Nature*, **201**, 13-17.

Разорванные гены и вставочные последовательности

Crick F., 1979. Split genes and RNA splicing in evolution of eukaryotic cells, *Science*, **202**, 1257-1260.

Jeffreys A.J., Flavell R.A., 1977. The

rabbit β -globin gene contains a large insert in the coding sequence, *Cell*, **12**, 1097-1108.

Breathnach R., Mandel J.L., Chambon P., 1977. Ovalbumin gene is split in chicken DNA, *Nature*, **270**, 314-319.

Cochet M., Gannon F., Hen R., Maroteaux L., Perrin F., Chambon P., 1979. Organisation and sequence studies of the 17-piece chicken conalbumin gene, *Nature*, **282**, 567-574.

Tilghman S.M., Tiemeier D.C., Seidman J.G., Peterlin B.M., Sullivan M., Majzel J.V., Leder P., 1978. Intervening sequence of DNA identified in the structural portion of a mouse β -globin gene, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **75**, 725-729.

Мутагенез

Hayes W., 1968. The Genetics of Bacteria and Their Viruses (2nd ed.), Wiley. (В гл. 13 четко и кратко описана природа мутаций.)

Drake J.W., Baltz R.H., 1976. The biochemistry of mutagenesis, *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 11-38.

Drake J.W., 1970. The Molecular Basis of Mutation, Holden-Day.

Выявление канцерогенов

Ames B.N., 1979. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer, *Science*, **204**, 587-593.

Devoret R., 1979. Bacterial tests for potential carcinogens. *Sci. Amer.*, **241**(2), 40-49.

McCann J., Spingarn N.E., Kabori J., Ames B.N., 1975. Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **72**, 979-983.

Вопросы и задачи

1. Какую последовательность аминокислот кодирует следующая последовательность оснований молекулы мРНК? Считайте, что рамка считывания начинается с 5'-конца: 5'-UUGCCU-AGUGAUUGGAUG-3'.
2. Какова последовательность полипептида, который образуется при добавлении poly(UUAC) в бесклеточную систему синтеза белка?
3. Одноцепочечную РНК вируса табачной мозаики обработали химическим мутагеном. Были получены мутанты, у которых в определенном положении вместо пролина располагается серин или лейцин. Повторная обработка мутант-

ной РНК тем же мутагеном привела к появлению в том же положении фенилаланина:



- а) Каковы предполагаемые кодоны для этих четырех аминокислот?
- б) Что применялось в качестве мутагена: 5-бромурацил, азотистая кислота или акридиновый краситель?
4. Специалист по химии белка сказал молекулярному генетику, что он нашел новый мутантный гемоглобин, в котором аспарат замещает лизин.

26. Генетический код. Зависимость гены-белки

Молекулярный генетик удивился и отправил своего приятеля еще поюзаться в лаборатории.

а) Почему молекулярный генетик выразил сомнения в возможности такой аминокислотной замены?

б) Какая аминокислотная замена показала бы молекулярному генетику более приемлемой?

5. Ниже приведены последовательности аминокислот в фрагменте лизоцима бактериофага Т4 дикого типа и мутанта:

	Дикий тип
-Thr-Lys-	Ser-Pro-Ser-Leu-Asn-Ala-Ala-Lys-
-Thr-Lys-	Val-His-His-Leu-Met-Ala-Ala-Lys-
	Мутант

а) Могла ли эта мутация возникнуть путем замены одной пары оснований в ДНК фага Т4? Если нет, то как мог возникнуть такой мутант?

б) Какова последовательность оснований мРНК, кодирующей пять аминокислот в белке дикого типа, отличающихся от той же последовательности у мутанта?

6. РНК-транскрипт одного участка ДНК фага G4 содержит последовательность 5'-AAAUGAGGA-3'. Этот фрагмент кодирует три различных белка. Каковы их последовательности?

Дополнительные вопросы см.: Wood W.B., Wilson J. H., Benbow R. M., Hood L. E., Biochemistry: A Problems Approach, Benjamin, 1974, ch. 19.

ГЛАВА 27

Синтез белка

Из предыдущей главы нам известно, что последовательность аминокислот в белках определяется последовательностью кодонов в мРНК, считываемых молекулами тРНК. Обратимся теперь к механизму синтеза белка. Этот процесс называется *трансляцией* (от англ. translation - перевод), так как информация, записанная на четырехбуквенном языке нуклеиновых кислот, переводится на язык белков, состоящий из 20 букв. Как и следовало ожидать, трансляция - процесс более сложный, чем репликация или транскрипция ДНК, которые происходят с использованием одного и того же языка спаривания оснований. Трансляция осуществляется в результате согласованного взаимодействия более чем сотни видов макромолекул. Помимо рибосом, необходимы молекулы тРНК, активирующих ферментов, растворимых факторов и мРНК.

Прежде чем перейти к подробному описанию синтеза белка, рассмотрим процесс в общих чертах. Белок синтезируется в направлении от аминоконца к карбоксильному концу путем последовательного присоединения аминокислот к карбоксильному концу растущей пептидной цепи. Аминоацил-тРНК, в которых карбоксильная группа аминокислоты присоединена к 3'-концу тРНК, играют в этом процессе роль активированных предшественников. Присоединение аминокислоты к соответствующей тРНК катализирует аминокацил-тРНК—синтетаза. Эта реакция активации, будучи аналогична активации жирных кислот, также запускается энергией гидролиза АТР. Для каждой аминокислоты имеется по крайней мере один вид тРНК и специфический активирующий фермент. Синтез белка осуществляется в три стадии, называемые инициацией, элонгацией и терминацией.

Инициация приводит к связыванию инициаторной тРНК с сигналом начала транскрипции в мРНК. Инициаторная тРНК занимает Р-участок рибосомы (от англ. peptidyl - пептидный) - один из двух участков связывания тРНК. *Элонгация* начинается со связывания аминокацил-тРНК с другим участком связывания тРНК на рибосоме, называемым А-участком (от англ. aminoacyl - аминокислотный). Затем образуется пептидная связь между аминокислотной группой второй аминокацил-тРНК и карбоксильной группой fMet, связанного с инициаторной тРНК. Теперь образовавшаяся в результате дипептидил-тРНК перемещается из А-участка в Р-участок, в то время как освободившаяся молекула тРНК покидает рибосому. Связывание аминокацил-тРНК, перемещение пептидил-тРНК из А-участка в Р-участок и одновременное перемещение рибосомы к следующему кодону мРНК требуют гидролиза ГТР. Затем новая аминокацил-тРНК связывается со свободным А-участком и начинается новый цикл реакции элонгации, подобный уже описанному. *Терминация* происходит тогда, когда стоп-кодон (сигнал терминации) в молекуле тРНК считается фактором освобождения белка. Это приводит к отделению завершенной полипептидной цепи от рибосомы. В настоящей главе мы будем говорить главным образом о синтезе белка в клетках *E.coli*, где этот процесс лучше всего изучен. Некоторые различия между синтезом белка у прокариот и эукариот будут рассмотрены в разд. 29.25.

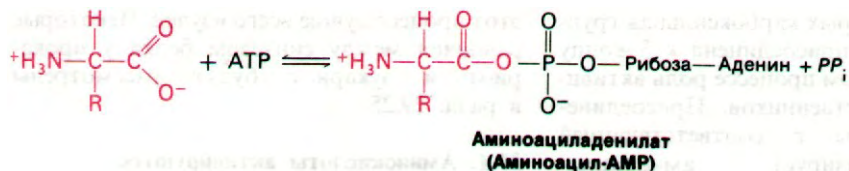
27.1. Аминокислоты активируются и присоединяются к транспортным РНК под действием специфических синтетаз

Образование пептидной связи между аминокислотой одной аминокислоты и COOH-группой другой аминокислоты термодина-

мически невыгодно. Этот термодинамический барьер преодолевается путем активации COOH-группы аминокислот-предшественников. *Активированными промежуточными продуктами синтеза белка служат эфиры аминокислот*, в которых карбоксильная группа аминокислоты связана с 2'-или 3'-гидроксильной группой рибозного остатка на 3'-конце тРНК. Аминоацильная группа может быстро перемещаться из 2'-положения в 3'-положение и обратно. Этот активированный промежуточный продукт называется *аминоацил-тРНК* (рис. 27.1).

Присоединение аминокислоты к тРНК имеет значение не только потому, что при этом активируется ее карбоксильная группа и она может образовать пептидную связь, но и потому, что аминокислоты сами по себе не способны узнавать кодоны в мРНК. Аминокислоты переносятся к рибосомам специфическими тРНК, которые и узнают кодоны в мРНК. Таким образом, эти тРНК выполняют роль адапторных молекул.

В 1957 г. Пол Замечник и Малон Хогланд (Paul Zamesnik, Mahlon Hoagland) установили, что активация аминокислот и их последующее присоединение к тРНК катализируются специфическими *аминоацил-тРНК-синтетазами*, которые также называют *активирующими ферментами*. В реакциях, катализируемых некоторыми синтетазами, первая стадия состоит в образовании *аминоациладенилата* из аминокислоты и АТР. Это активированное соединение представляет собой смешанный ангидрид, в котором карбоксильная группа аминокислоты присоединена к фосфатной группе АМР. Другие синтетазы катализируют реакцию АТР, аминокислоты и тРНК без промежуточного образования доступного для обнаружения аминоациладенилата.



Следующий этап - перенос аминоацильной группы аминоацил-АМР на молекулу тРНК с образованием *аминоацил-тРНК*-активированного промежуточного продукта в синтезе белка. Переносится ли аминоа-

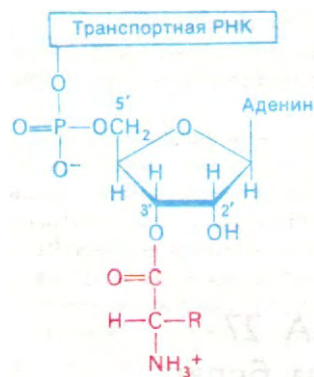
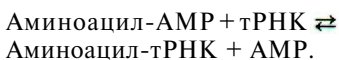


Рис. 27.1. В аминоацил-тРНК аминокислота связана эфирной связью с 2'- или 3'-гидроксильной группой концевой аденозина.

цильная группа на 2'- или 3'-гидроксильную группу рибозного остатка на 3'-конце тРНК, зависит от того, о какой аминокислоте и какой аминоацил-тРНК-синтетазе идет речь. Активированная аминокислота может очень быстро перемещаться из 2'- в 3'-положение и обратно.



Суммарная реакция этапов активации и переноса описывается следующим уравнением:



$\Delta G'$ для этой реакции близко к нулю, так как свободная энергия гидролиза эфирной связи аминоацил-тРНК соответствует свободной энергии гидролиза концевой фосфо-

рильной группы АТР. Что же в таком случае запускает синтез аминоацил-тРНК? Как и можно было ожидать, реакция запускается гидролизом пирогосфата. Суммарная реакция этих превращений высокоэкзергонична:



Таким образом, на синтез аминоксил-тРНК затрачиваются две богатые энергией фосфатные связи. Одна из них расходуется на образование эфирной связи аминоксил-тРНК, другая сдвигает равновесие реакции в сторону образования продукта.

Стадии активации и переноса определенной аминокислоты катализируются одной и той же аминоксил-тРНК—синтетазой. В действительности аминоксил-АМР не диссоциирует из комплекса с синтетазой. Он прочно связывается с активным центром фермента нековалентными взаимодействиями. В норме аминоксил-АМР, образующийся в качестве промежуточного продукта синтеза аминоксил-тРНК, существует в течение непродолжительного времени, но он вполне стабилен и может быть легко выделен, если в реакционной смеси нет тРНК.

Мы уже встречались с ациладенилатным промежуточным продуктом при активации жирных кислот (разд. 17.6). Интересно отметить, что Пол Берг (Paul Berg) первым открыл этот промежуточный продукт в реакции активации жирных кислот, и он же позже выяснил, что этот продукт образуется также при активации аминокислот. Основное различие между этими реакциями состоит в том, что в первом случае роль акцептора ацильных групп играет СоА, а во втором - тРНК. Энергетика этих биосинтетических реакций очень сходна: обе они становятся необратимыми благодаря гидролизу неорганического пирофосфата.

Для каждой аминокислоты имеется по крайней мере одна аминоксил-тРНК—синтетаза. Эти ферменты различаются по размеру, субъединичной структуре и аминокислотному составу (табл. 27.1).

Таблица 27.1. Свойства некоторых аминоксил-тРНК-синтетаз			
Источник	Специфичность к аминокислоте	Масса, кДа	Субъединичная структура
<i>E.coli</i>	Гистидин	85	α_2
<i>E.coli</i>	Изолейцин	114	Одна цепь
<i>E.coli</i>	Лизин	104	α_2
<i>E.coli</i>	Глицин	227	$\alpha_2\beta_2$
Дрожжи	Лизин	138	α_2
Дрожжи	Фенилалакин	270	$\alpha_2\beta_2$
Поджелудочная железа быка	Триптофан	108	α_2

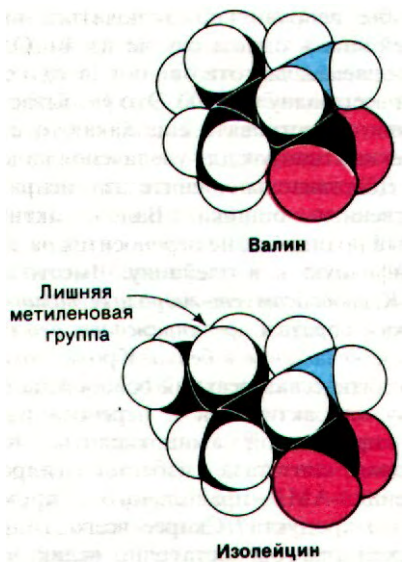


Рис. 27.2. Пространственные модели валина и изолейцина. Синтетазы, активные в отношении этих аминокислот, высоко специфичны.

27.2. Надежность синтеза белка определяется высокой специфичностью аминоксил-тРНК-синтетаз

Правильная трансляция генетических матриц обеспечивается высокой специфичностью аминоксил-тРНК—синтетаз. Эти ферменты весьма избирательны в отношении активируемых аминокислот и соответствующей тРНК-акцептора. Как будет указано несколько ниже, молекулы тРНК, акцептирующие различные аминокислоты, имеют различные последовательности оснований, благодаря чему синтетазы легко узнают их. Гораздо более сложная задача для этих ферментов - различать сходные аминокислоты. Например, единственное различие между изолейцином и валином состоит в том, что изолейцин содержит лишнюю метиленовую группу (рис. 27.2). Дополнительная энергия связывания, которую вносит эта лишняя группа —CH₂—, благоприятствует тому, что активация изолейцина происходит примерно в 200 раз чаще, чем активация валина. Концентрация валина *in vivo* примерно в 5 раз выше концентрации изолейцина, так что валин должен

был бы неправильно включаться вместо изолейцина в одном случае из 40. Однако наблюдаемая частота ошибок *in vivo* составляет всего одну на 3000. Это указывает, что должна существовать еще какая-то стадия коррекции ошибок для увеличения надежности. Действительно, синтетаза исправляет собственные ошибки. Валин, активированный по ошибке, не переносится на тРНК, специфичную к изолейцину. Вместо этого *тРНК способствует гидролизу валин-АМР и таким образом предупреждает его неправильное включение в белки.* Кроме того, эта гидролитическая реакция освобождает синтетазу для активации и переноса изолейцина правильной аминокислоты. Каким образом синтетаза избегает гидролиза изолейцин-АМР-правильного промежуточного продукта? Скорее всего, гидролитический участок достаточно велик, чтобы там поместился валин-АМР, но слишком мал для связывания изолейцин-АМР.

Многие другие аминоксил-тРНК-синтазы также содержат, помимо участков синтеза, гидролитические участки. Возможно, эти участки действуют как *двойные фильтры*, обеспечивающие высокую надежность. Участок синтеза отбрасывает аминокислоты, превышающие по размеру нужную аминокислоту, а гидролитический участок разрушает те активированные промежуточные продукты, которые *меньше* по размеру, чем требуется. Очевидно, *высокая надежность синтеза белка в первую очередь зависит от механизма коррекции с помощью гидролитической активности, которой обладают многие аминоксил-тРНК-синтазы.*

27.3. Молекулы транспортных РНК имеют общий план строения

В 1965 г, Роберт Холли (Robert Holley) после семи лет упорных поисков впервые определил последовательность оснований одной из транспортных РНК. При исследовании дрожжевой аланиновой тРНК была получена первая полная последовательность нуклеиновой кислоты. Эта работа стала источником новых идей, касающихся биологической активности молекулы тРНК. В процессе расшифровки последовательности Холли разработал общие методы для определения последовательности нуклеотидов в нуклеиновых кислотах. Последовательность дрож-



Рис. 27.3. Исправление ошибок с помощью гидролиза ошибочного продукта.

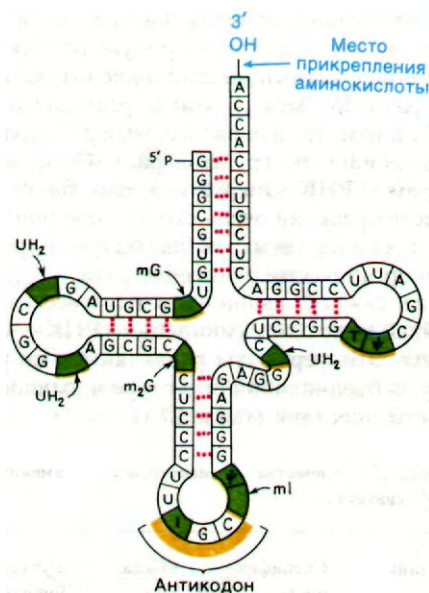


Рис. 27.4. Последовательность оснований дрожжевой аланиновой тРНК. Модифицированные нуклеозиды (отмечены зеленым) сокращенно обозначаются следующим образом: инозин - I, метилинозин - mI, дигидроуридин - UH₂, риботимидин - T, псевдоуридин - ψ, метилгуанозин - mG и диметилгуанозин - m₂G.

жевой аланиновой тРНК показана на рис. 27.4. Молекула представляет собой одну цепь из 76 рибонуклеотидов. 5'-конец фосфорилирован (pG), а 3'-конец имеет свободную 3'-гидроксильную группу. Характерная особенность этой молекулы - высокое содержание оснований, отличных от А, U, G и С. В ней содержится девять необычных нуклеотидов: инозин, псевдоуридин, дигидроуридин, риботимидин и метилированные производные гуанозина и инозина. *Участок прикрепления аминокислоты* представляет собой 3'-гидроксильную группу остатка аденозина на 3'-конец молекулы. Последовательность IGC в середине молекулы - *антикодон*. Он комплементарен GCC - одному из кодонов аланина.



Вскоре были определены последовательности нескольких других молекул тРНК. К настоящему времени уже известны последовательности более 70 тРНК. Самое удивительное, что все эти последовательности можно изобразить в форме клеверного листа, в котором около половины нуклеотидов образует пары оснований. Следовательно, *молекулы тРНК обладают многими общими структурными особенностями*. В этом факте нет ничего неожиданного, так

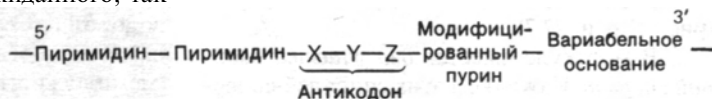
тилированные производные А, U, С и G, которые образуются путем ферментативной модификации тРНК-предшественника (разд. 25.17). Роль этих необычных оснований неизвестна. Вполне возможно, что метилирование препятствует спариванию некоторых оснований и делает их таким образом доступными для других взаимодействий. Кроме того, метилирование изменяет гидрофобность некоторых участков тРНК, что может иметь важное значение для их взаимодействия с синтетазами и рибосомными белками.

3. 5'-конец тРНК фосфорилирован. На 5'-конец обычно расположен остаток pG.

4. На 3'-конец всех тРНК находится последовательность CCA. Активированная аминогруппа прикрепляется к 3'-гидроксильной группе концевого аденозина.

5. Примерно половина нуклеотидов тРНК спарена и образует участки двойной спирали (рис. 27.5). Не спарены пять групп оснований: *3'-концевая область CCA (акцепторная ветвь)*; *ТψС-петля*, которая получила свое название по последовательности риботимидин - псевдоурацил - цитозин; *добавочная петля*, число остатков которой различно в разных тРНК; *дигидроуридиловая петля*, которая содержит несколько остатков дигидроуридина; *антикодоновая петля*.

6. *Антикодоновая петля* состоит из семи оснований, расположенных в следующей последовательности:



как все молекулы тРНК должны взаимодействовать примерно одинаковым образом с рибосомами и мРНК. Говоря конкретно, все молекулы тРНК должны укладываться в А- и Р-участки рибосомы и должны взаимодействовать с ферментом, катализирующим образование пептидной связи.

Все молекулы транспортных РНК обладают следующими общими свойствами.

1. Все они представляют собой одну цепь длиной от 73 до 93 рибонуклеотидов (масса около 25 кДа).

2. Они содержат много необычных оснований, как правило, от 7 до 15 на молекулу. Многие из этих необычных оснований представляют собой метилированные или диме-

27.4. Транспортная РНК имеет L-образную форму

К настоящему времени трехмерная структура молекулы тРНК установлена на атомном уровне благодаря рентгеновским кристаллографическим исследованиям, осуществленным в лабораториях Александра Рича и Арона Клуга (Alexander Rich, Aaron Klug). В результате проведенного ими независимого рентгенографического изучения фенилаланиновой тРНК получено множество новых данных о структуре молекулы тРНК.

27. Синтез белка

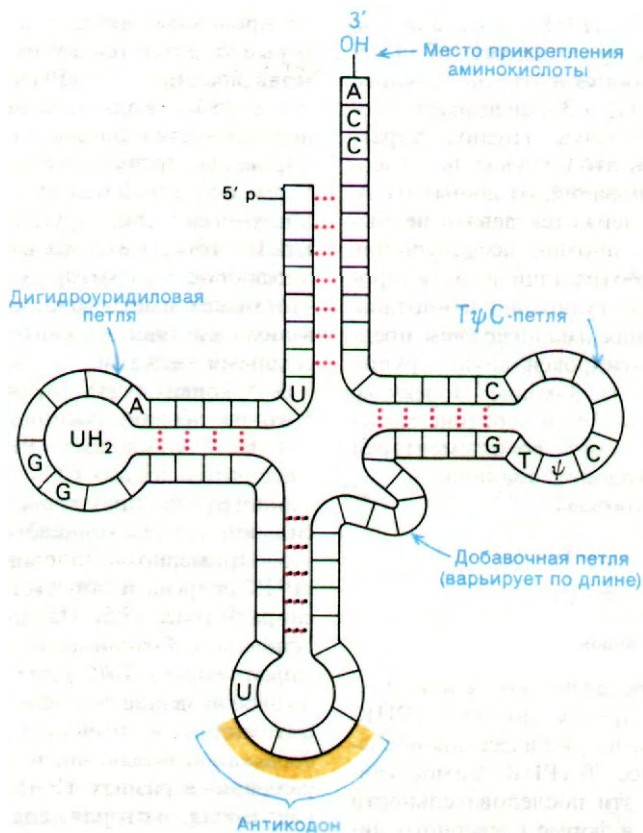


Рис. 27.5. Общая схема строения молекулы тРНК.

1. Молекула имеет *L-образную форму* (рис. 27.6 и 27.7).

2. В молекуле имеется *два участка двойной спирали*. Каждая из этих спиралей содержит примерно десять пар оснований, что соответствует одному витку спирали. Спиральные участки расположены перпендикулярно друг другу, что и придает молекуле *L-образную форму*. Схема спаривания оснований, постулированная в модели клеверного листа, построенной по результатам определения последовательности, оказалась правильной.

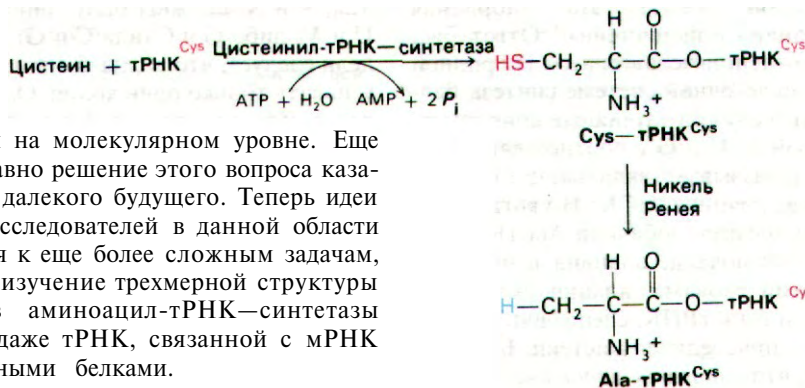
3. Большинство оснований вне спиральных участков образует необычные водородные связи. Эти *третичные взаимодействия* возникают между основаниями, которые обычно не комплементарны друг другу (например, G—G, A—A и A—C). Более того, рибозофосфатный остов взаимо-

действует с некоторыми основаниями и даже с другим участком самого остова. Во многих подобных взаимодействиях 2'-ОН-группа остатков рибозы выступает в качестве донора или акцептора при образовании водородных связей. Кроме того, значительная часть оснований упакована в стопки (межплоскостные взаимодействия). Эти гидрофобные взаимодействия между соседними ароматическими кольцами играют основную роль в молекулярной архитектуре.

4. ССА-конец - *участок прикрепления аминокислоты* - расположен на одном из концов L. Другой конец L представляет собой *антикодонную петлю*. Таким образом, *аминокислота, связанная в аминоацил-тРНК, удалена от антикодона* (на расстояние примерно 80 Å). Дигидроуридиловая петля и ТψС-петля образуют угол буквы L.

5. ССА-конец и прилегающая к нему спиральная область не очень сильно взаимодействуют с остальной молекулой. Эта часть молекулы может изменять конформацию при активации аминокислоты и при синтезе белка на рибосоме.

Определение трехмерной структуры тРНК - важный шаг в изучении процесса



трансляции на молекулярном уровне. Еще совсем недавно решение этого вопроса казалось делом далекого будущего. Теперь идеи и усилия исследователей в данной области обращаются к еще более сложным задачам, таким, как изучение трехмерной структуры комплексов аминоацил-tRNA-синтетазы с tRNA и даже tRNA, связанной с мРНК и рибосомными белками.

27.5. В узнавании кодона участвует антикодон, а не активированная аминокислота

Мы уже упоминали, что антикодон tRNA-участок, узнающий кодон мРНК, и что узнавание происходит путем спаривания оснований. Играет ли какую-нибудь роль в этом процессе аминокислота, присоединенная к tRNA? Ответ на этот вопрос был получен следующим путем. Вначале цистеин присоединили к соответствующей tRNA (она обозначается tRNA^{Cys}). Затем

присоединенный остаток цистеина превратили в аланин, обработав $\text{Cys-tRNA}^{\text{Cys}}$ никелем Ренея. В результате атом серы отделился от активированного остатка цистеина; связь цистеина с tRNA при этом не затрагивалась.

Так была получена гибридная аминоацил-tRNA, в которой аланин ковалентно присоединен к tRNA, специфичной к цистеину.

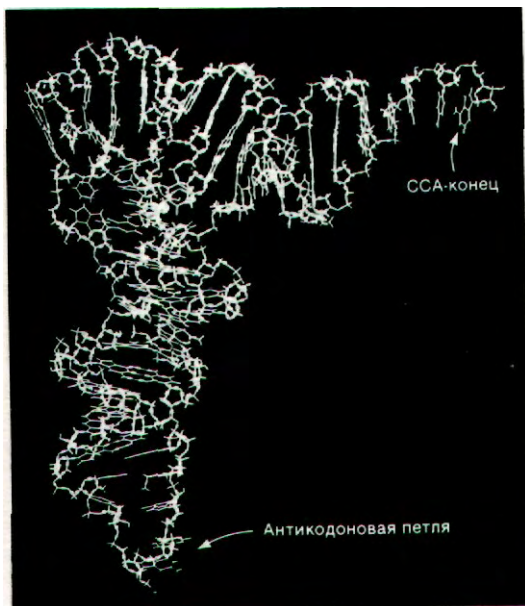


Рис. 27.6. Фотография скелетной модели дрожжевой фенилаланиновой tRNA, основанная на карте электронной плотности с разрешением 3 Å. (Печатается с любезного разрешения д-ра Sung-Hou Kim.)

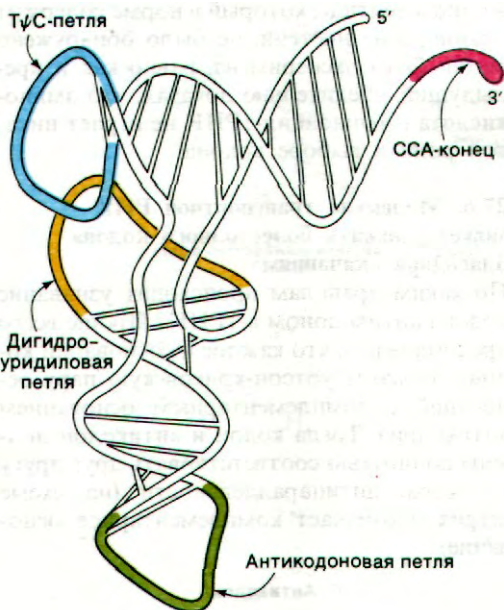


Рис. 27.7. Схематическое изображение трехмерной структуры дрожжевой фенилаланиновой tRNA. (По рисунку, любезно предоставленному д-ром Sung-Hou Kim.)

Какой кодон узнаёт эта гибридная тРНК - аланина или цистеина? Ответ был получен при использовании этой гибридной тРНК в бесклеточной системе синтеза белка. Матрицей служил случайный сополимер, построенный из U и G в соотношении 5:1; в норме он вызывает включение цистеина (UGU), но не аланина (GCX). Но когда в инкубационную смесь добавили Ala-тРНК^{Cys}, произошло включение аланина в полипептид. Другими словами, аланин включался так, как если бы к тРНК, специфичной к цистеину, был присоединен цистеин. Был сделан вывод, что *узнавание кодона не зависит от аминокислоты, прикрепленной к тРНК*.

Такой же результат был получен в тех случаях, когда роль матрицы выполняла гемоглобиновая мРНК. В качестве гибридной аминоацил-тРНК использовали ¹⁴C-аланил-тРНК^{Cys}. Единственный радиоактивный триптический пептид (т. е. пептид, содержащий ¹⁴C-аланин) соответствовал пептиду, который в норме содержит цистеин, а не аланин. С другой стороны, ни в одном пептиде, который в норме содержит аланин, а не цистеин, не было обнаружено метки. Этот эксперимент, равно как и предыдущий, убедительно доказал, что аминокислота в аминоацил-тРНК не играет никакой роли в выборе кодона.

27.6. Молекула транспортной РНК может узнавать более одного кодона благодаря «качаниям»

По каким правилам происходит узнавание кодона антикодоном в тРНК? Проще всего предположить, что каждое из оснований кодона образует уотсон-криковскую пару оснований с комплементарным основанием антикодона. Тогда кодон и антикодон должны полностью соответствовать друг другу с учетом антипараллельности (на схеме стрих обозначает комплементарное основание):



Так, X и X' должны быть либо A и U (или U и A), либо G и C (или C и G). Из этой модели следует, что каждый антикодон может узнавать только один кодон. Однако факты, которыми мы располагаем, противоречат этому. *Некоторые выделенные в чистом виде молекулы тРНК могут узнавать более одного кодона*. Например, дрожжевая аланиновая тРНК, изученная Холли, связывается с *тремя* кодонами: GCU, GCC и GCA. Только первые два основания этих кодонов одинаковы, третье различается. Может быть, узнавание третьего основания кодона иногда менее избирательно, чем узнавание двух других? Общая картина вырожденности генетического кода показывает, что дело может обстоять именно так. XYU и XYZ *всегда* кодируют одну и ту же аминокислоту, а XYA и XYG *обычно* имеют одинаковый смысл. Исходя из этих данных, Крик предположил, что на спаривание третьего основания должны накладываться менее строгие стерические ограничения, чем на спаривание двух других. Были построены модели различных вариантов спаривания оснований, чтобы определить, какие из них сходны со стандартными A—U- и G—C-парами в отношении расстояния и угла между гликозидными связями. В это исследование был включен инозин, так как он встречается в некоторых антикодонах. Если предположить, что в спаривании третьего основания кодона допустима некоторая стерическая свобода («качание», или неоднозначное соответствие), то комбинации, приведенные в табл. 27.2, кажутся вполне возможными.

В настоящее время правомочность гипотезы «качаний» доказана. Антикодоны тРНК с известной последовательностью связываются с теми кодонами, которые предсказывает эта теория. Например, антикодом дрожжевой аланиновой тРНК

Таблица 27.2. Допустимые типы спаривания третьего основания кодона в соответствии с гипотезой «качаний»

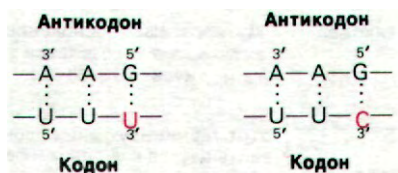
Первое основание антикодона	Третье основание кодона
C	G
A	U
U	A или G
G	U или C
I	U, C или A

является IGC. Эта тРНК узнает кодоны GCU, GCC и GCA:



Итак, I спаривается с U, C и A, как и предсказывает теория.

Фенилаланиновая тРНК, имеющая антикодон GAA, узнает кодоны UUU и UUC, но не UUA и UUG:



Таким образом, G спаривается с U или с C в третьем положении кодона, как и предсказывает гипотеза качаний.

Можно сделать два обобщения, касающихся кодон-антикодонового взаимодействия.

1. Первые два основания кодона спариваются обычным образом. Узнавание происходит точно. Следовательно, кодоны, которые различаются по одному из первых двух оснований, должны узнаваться различными тРНК. Например, и UUA, и CUA кодируют лейцин, но считываются различными тРНК.

2. Первое основание антикодона определяет, считывает ли данная молекула тРНК один, два или три типа кодонов: C и A узнают по одному кодону, U и G - по два кодона, I - три кодона. Итак, одна из причин вырожденности генетического кода заключается в неточности, или неоднозначности, спаривания («качании») третьего основания кодона. Именно в этом мы усматриваем основную причину распространенности необычного нуклеотида инозина в антикодонах. Инозин увеличивает число кодонов, которые способна считывать данная молекула тРНК (рис. 27.8).

27.7. Мутантные молекулы транспортных РНК могут подавлять другие мутации

Новый этап в изучении процесса узнавания кодона начался в связи с исследованиями мутантных тРНК, в которых изменено одно

основание в антикодоне. Эти спонтанные события противоположны по своей сути химической модификации *in vitro* аминокислоты, прикрепленной к тРНК. Любопытна история открытия таких мутантных тРНК. В течение многих лет генетики знали, что повреждающее действие некоторых мутаций может быть подавлено другой мута-

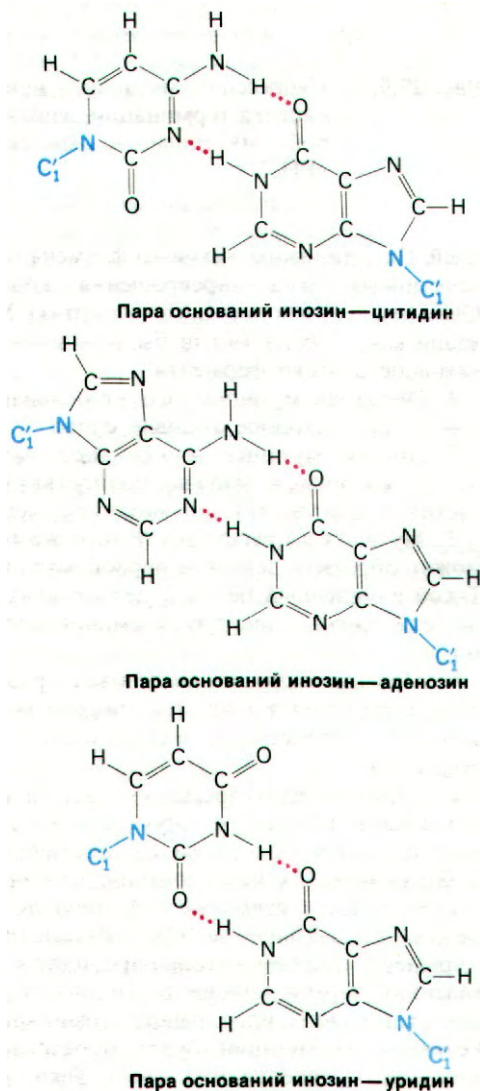


Рис. 27.8. Благодаря «качаниям» инозин может давать пары оснований с цитозином, аденином и урацилом.

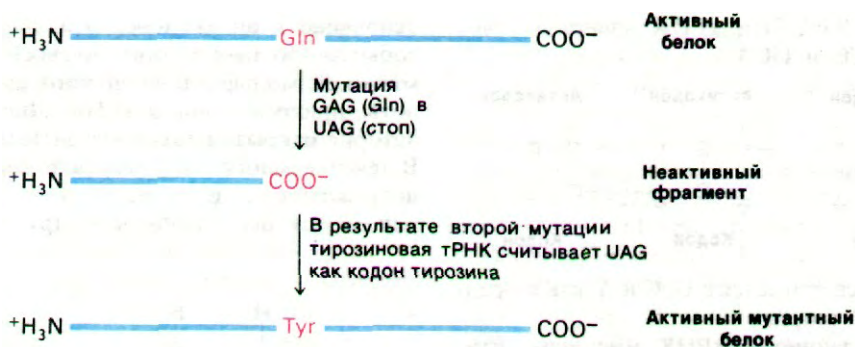
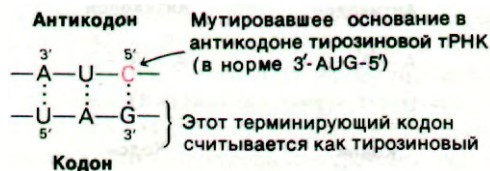


Рис. 27.9. Супрессия мутации, приводящей к терминации цепи, второй мутацией в молекуле тРНК.

различных генах. Один из этих супрессоров считывает UAG как кодон тирозина,



цией. Предположим, какой-то фермент стал неактивным из-за превращения кодона GCU (аланин) в кодон GAU (аспаратат). Мутации какого рода могли бы восстановить активность этого фермента?

1. Обратная мутация того же основания $A \rightarrow C$ даст исходное кодовое слово.

2. Другая мутация $A \rightarrow U$ даст валин (GUU), который, возможно, полностью или частично восстановит активность фермента.

3. Мутация в другом месте того же гена может обратить действие первой мутации. Такой измененный белок будет отличаться от белка дикого типа двумя аминокислотами.

4. Мутация в другом гене может преодолеть повреждающее действие первой мутации. Это явление называется *межгенной супрессией*.

В течение долгого времени механизм действия межгенных супрессоров оставался загадкой. Теперь мы знаем из генетических и биохимических исследований, что *большинство таких супрессоров действует, изменяя считывание мРНК*. Рассмотрим к примеру мутацию, которая приводит к появлению терминирующего кодона UAG (т. е. стоп-кодона, или сигнала терминации). Результатом мутации будет образование неполных полипептидных цепей. Такие мутации называются *нонсенс-мутациями* (от англ. nonsense - бессмысленный), так как неполные полипептиды обычно неактивны. Действие нонсенс-мутации UAG может быть подавлено мутациями в нескольких

что может привести к синтезу активного белка вместо неполной полипептидной цепи (рис. 27.9). Почему же эта мутантная РНК вставляет тирозин в ответ на кодон UAG? В норме тирозиновая тРНК узнает кодоны UAC и UAU. Эта мутантная тРНК идентична нормальной тирозиновой тРНК, за исключением одной замены основания в антикодоне: $GUA \rightarrow CUA$. Мутация $G \rightarrow C$ первого основания антикодона меняет специфичность узнавания. Как предсказывает теория «качаний», измененный антикодон может узнавать только UAG.

Супрессорная тРНК этого типа будет закреплена отбором скорее всего в том случае, если мутировавшая тРНК не была необходимой. Иными словами, должна существовать другая разновидность тРНК, которая узнает те же кодоны, что и мутировавшая тРНК. Действительно, у *E. coli* имеются две различные тРНК, которые в норме узнают кодоны UAC и UAU. Изменяется та тРНК, которая присутствует в небольшом количестве. Функция этой минорной разновидности тирозиновой тРНК в норме неясна. В связи с существованием такой супрессорной мутации возникает еще один вопрос. Если мутантный кодон в UAG считывается как тирозин, а не как сигнал терминации, что происходит при нормальной терминации цепей? Как ни странно, большинство полипептидных цепей в клетках супрессорного мутанта терминируется нормально, возможно, по той причине, что сигнал тер-

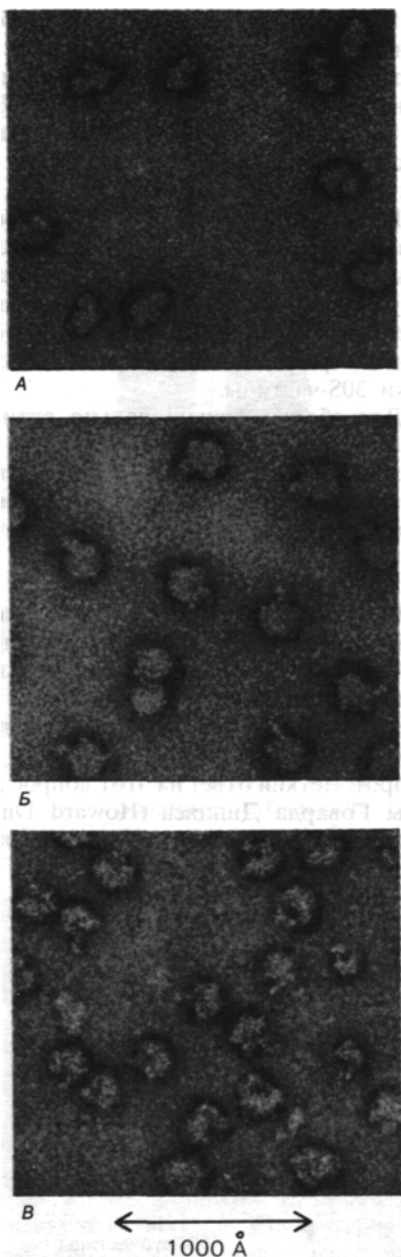


Рис. 27.10. Электронные микрофотографии 70S-рибосом (А), 50S-субчастиц (Б) и 30S-субчастиц (В). (Печатается с любезного разрешения д-ра James Lake.)

минации представляет собой нечто большее, чем просто кодон UAG. Действительно, известно, что некоторые кодирующие последовательности заканчиваются двумя различными стоп-кодонами. Кроме того,

супрессия не обладает стопроцентной эффективностью.

Были обнаружены и другие виды мутантных тРНК. *Миссенс-супрессоры* изменяют считывание мРНК, так что в ответ на некоторые кодоны вставляется измененная аминокислота (например, глицин вместо аргинина). Особенно интересны *супрессоры сдвига рамки*. Одна из таких тРНК содержит лишнее основание в антикодонной петле. Благодаря этому она считывает в качестве кодона *четыре* основания вместо трех. Например, UUUC считывается как кодон фенилаланина вместо UUU. Такая измененная тРНК может супрессировать вставку лишнего основания.

27.8. Рибосомы - органеллы, в которых происходит синтез белка,- состоят из большой и малой субчастиц

Перейдем теперь к механизму синтеза белка. Этот сложный процесс происходит в рибосомах, которые можно рассматривать как органеллы синтеза белка, подобно тому как митохондрии считают органеллами окислительного фосфорилирования. Рибосома - весьма специализированная и сложная структура. Ее диаметр - примерно 200 Å. Лучше всего изучены рибосомы *E.coli*. Масса этой рибосомы составляет 2500 кДа, а коэффициент седиментации 70S. Ее можно диссоциировать на *большую (50S) и малую (30S) субчастицы*. Далее эти субчастицы можно диссоциировать на составляющие их белки и РНК. 30S-субчастица содержит 21 белок и одну молекулу 16S-РНК. 50S-субчастица содержит примерно 34 белка и 2 молекулы РНК (23S и 5S). Рибосома *E.coli* примерно на две трети состоит из РНК и на одну треть - из белка.

Рибосомы цитоплазмы эукариотических клеток несколько крупнее бактериальных рибосом. Интактная эукариотическая рибосома имеет коэффициент седиментации 80S. Подобно бактериальной рибосоме, она диссоциирует на *большую (60S) и малую (40S) субчастицы*. Малая субчастица содержит одну молекулу 18S-РНК, а большая субчастица - три молекулы РНК (28S, 7S¹⁾ и 5S). Рибосомы митохондрий и хлоропластов отличаются от цитоплазматических рибосом

¹ Эту рРНК по сложившейся традиции чаще обозначают 5,8S-РНК.- *Прим. перев.*

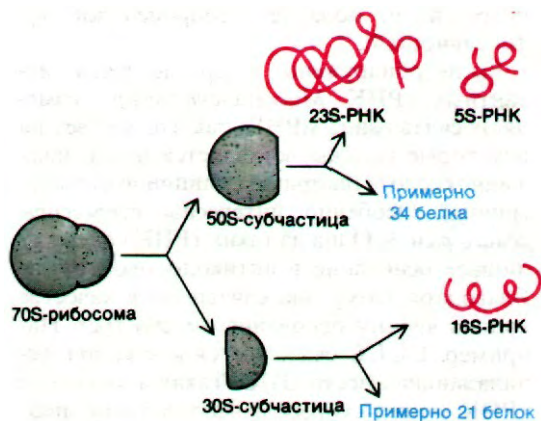


Рис. 27.11. Рибосомы можно диссоциировать примерно на 55 белков и три молекулы РНК.

эукариот. Они больше похожи на 70S-частицы, а не на 80S. Между синтезом белка в митохондриях, хлоропластах и бактериях имеется много общего.

27.9. Рибосомы можно реконструировать из составляющих их молекул белков и РНК

Рибосомную 30S-субчастицу можно реконструировать из смеси 16S-РНК и 21 белка, входящего в ее состав. Сборку этих компонентов с образованием функционально активной 30S-субчастицы впервые осуществил Масаясу Номура (Masayasu Nomura) в 1968 г. Через несколько лет была реконструирована 50S-субчастица. Эти эксперименты имели важное значение в двух отношениях. Во-первых, они продемонстрировали, что вся информация, необходимая для сборки этой органеллы, содержится в структуре ее компонентов. Для сборки не нужны никакие внерибосомные факторы. Таким образом, *образование рибосом in vitro представляет собой процесс самосборки*. Во-вторых, реконструкцию можно использовать для того, чтобы выяснить, необходим ли тот или иной компонент для сборки рибосомы или собственно для ее функционирования. Например, таким образом был выявлен компонент рибосомы, отвечающий за ее чувствительность к антибиотику стрептомицину (разд. 27.20). Из работ по реконструкции 30S-субчастицы были сделаны следующие выводы.

1. 16S-РНК необходима для ее сборки и функционирования. Эта потребность весьма специфична, так как 16S-РНК из дрожжей не может заменить 16S-РНК из *E.coli*. Роль молекул рибосомной РНК остается областью пристального интереса со стороны исследователей.

2. В опытах по реконструкции каждый раз из системы исключали один из белков, чтобы выяснить, может ли интактная 30S-субчастица образоваться из остальных 20 белков и 16S-РНК. Оказалось, что по крайней мере шесть белков необходимо для сборки 30S-частицы.

3. Для сборки функционально активной 30S-частицы необходимо большинство входящих в нее белков. Итак, *30S-субчастица представляет собой кооперативную целостную в функциональном отношении структуру*.

27.10 Белки синтезируются в направлении от аминоконца к карбоксильному концу

Одним из первых вопросов, касающихся механизма синтеза белка, был вопрос о том, синтезируются ли белки в направлении от аминоконца к карбоксильному концу или наоборот. Четкий ответ на этот вопрос дали опыты Говарда Динциса (Howard Dintzis) с импульсной меткой. Ретикулоциты, актив-



Рис. 27.12. Разделение белков рибосомной 50S-субчастицы с помощью двумерного электрофореза в полиакриламидном геле. (Печатается с любезного разрешения д-ра Charles Cantor.)

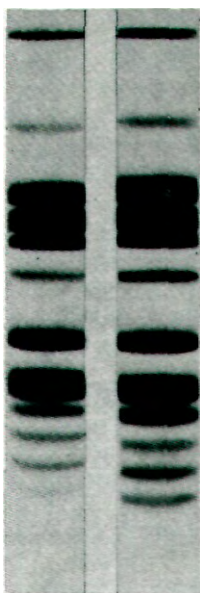


Рис. 27.13. Электрофоретическое разделение в полиакриламидном геле белков нативной рибосомной 30S-субчастицы (слева) и реконструированной 30S-субчастицы (справа). В реконструированной субчастице присутствуют все те же белки, что и в нативной. (Печатается с любезного разрешения д-ра Masayasu Nomura.)

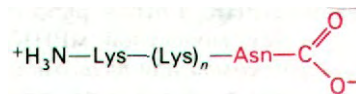
но синтезирующие гемоглобин, инкубировали в присутствии ^3H -лейцина в течение коротких промежутков времени, недостаточных для синтеза полных цепей. Синтезированный в этих условиях гемоглобин разделяли на α - и β -цепи и обрабатывали трипсином. Затем определяли удельную радиоактивность полученных пептидов, т.е. отношение их радиоактивности к общему содержанию лейцина. В пептидах, расположенных в нативном белке вблизи карбоксильного конца, было больше радиоактивности, чем в пептидах вблизи аминоконца. Наблюдалось постепенное возрастание радиоактивности от аминоконца к карбоксильному концу (рис. 27.14). Сильнее всего был помечен карбоксильный конец, так как он синтезировался последним. Следовательно, направление роста цепей — от аминоконца к карбоксильному концу.

27.11. Информационная РНК транслируется в направлении $5' \rightarrow 3'$

Направление считывания мРНК определяли с помощью синтетического полинуклеотида



использованного в качестве матрицы в бесклеточной системе синтеза белка. AAA кодирует лизин, а AAC-аспарагин. Полипептидный продукт имел структуру



Поскольку аспарагин был расположен на карбоксильном конце, кодон AAC был считан последним. Следовательно, трансляция идет в направлении $5' \rightarrow 3'$. Напомним, что мРНК также синтезируется в направлении $5' \rightarrow 3'$ (разд. 25.14). Это означает, что мРНК может транслироваться уже в то время, когда она еще синтезируется. Действительно,

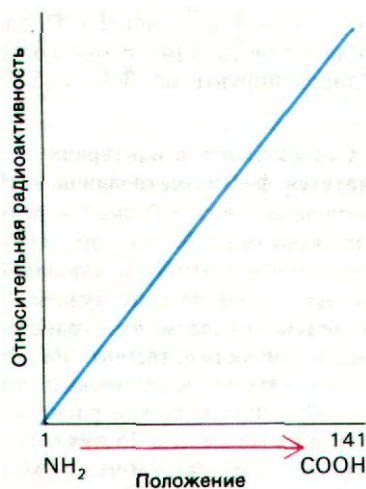


Рис. 27.14. Распределение ^3H -лейцина в α -цепи гемоглобина, синтезированного после инкубации ретикулоцитов в течение короткого времени в присутствии метки. Более высокая радиоактивность С-конца по сравнению с N-концом указывает, что С-конец синтезируется последним.

у *E.coli* 5'-конец мРНК взаимодействует с рибосомами вскоре после того, как он синтезируется (рис. 27.15). Таким образом, *трансляция тесно сопряжена с транскрипцией*.

27.12. Одну молекулу мРНК одновременно транслирует несколько рибосом

Одну молекулу мРНК могут одновременно транслировать несколько рибосом. Это существенно увеличивает эффективность использования мРНК. Группа рибосом, связанных с одной молекулой мРНК, называется *полирибосомой* или *полисомой*. Рибосомы, входящие в состав этой структуры, работают независимо, и каждая из них синтезирует полную полипептидную цепь. При максимальной плотности рибосом на мРНК одна рибосома приходится на 80 нуклеотидов. Полирибосомы, синтезирующие гемоглобин (цепь гемоглобина содержит 145 аминокислот, а мРНК - соответственно 500 нуклеотидов), обычно состоят из пяти рибосом. Рибосомы, расположенные ближе всего к 5'-концу мРНК, несут самые короткие полипептидные цепи, а те, что ближе к 3'-концу, - почти полные цепи. После освобождения полипептидного продукта рибосомы диссоциируют на 30S- и 50S-субчастицы.

27.13. Синтез белка в бактериях инициируется формилметиониновой тРНК

Как начинается синтез белка? *A priori* простейшая возможность состоит в том, что транслируется вся мРНК, и никакие особые сигналы начала синтеза не нужны. Однако эксперименты показали, что трансляция не начинается непосредственно на 5'-конце мРНК. На самом деле первый транслируемый кодон почти всегда расположен на расстоянии не менее чем 25 нуклеотидов от 5'-конца. К тому же многие молекулы мРНК у прокариот *полицистронны*, т.е. кодируют две или более полипептидные цепи. Например, одна молекула мРНК длиной около 7000 нуклеотидов кодирует пять ферментов пути биосинтеза триптофана у *E.coli*. Каждый из этих пяти ферментов имеет собственные сигналы начала и конца трансляции в мРНК. На деле *все изученные молекулы бактериальных мРНК содержат сигналы начала и конца каждой кодируемой ими полипептидной цепи*.

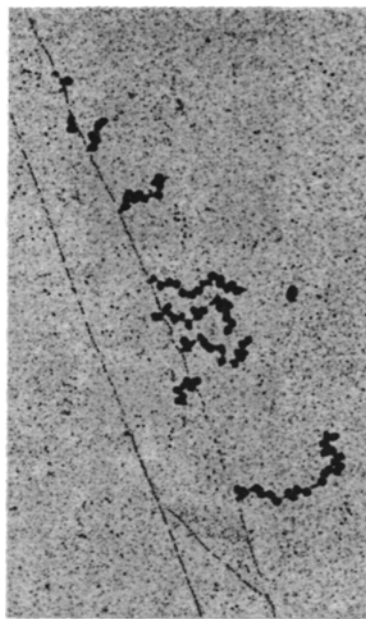


Рис. 27.15. Транскрипция участка ДНК *E.coli* и трансляция новообразующейся мРНК. Транскрибируется лишь часть хромосомы. [Miller O. L., Hamkalo B. A., Thomas C. A., Jr., Visualization of Bacterial Genes in Action, Science, 169, 392 (1970).]

Ключом к изучению механизма инициации цепи стало открытие того факта, что примерно половина N-концевых аминокислот белков *E.coli* - метионин, хотя в других положениях полипептидной цепи эта аминокислота встречается редко. Кроме того, N-конец новообразованных белков обычно модифицирован, из чего следует, что в инициации, очевидно, участвует какое-то производное метионина. Действительно, *синтез белка у бактерий начинается с формилметионина (fMet)*. Существует особая тРНК, которая переносит формилметионин к рибосоме для инициации синтеза белка. Эта *инициаторная тРНК* (сокращенно обозначается *тРНК_i*) отличается от той тРНК, которая вводит метионин во внутренние положения (сокращенно *тРНК_m*). Буква *f* указывает, что метионин, присоединенный к инициаторной тРНК, может быть формилирован, тогда как метионин, присоединенный к *тРНК_m*, - нет.

Метионин присоединяет к этим двум раз-

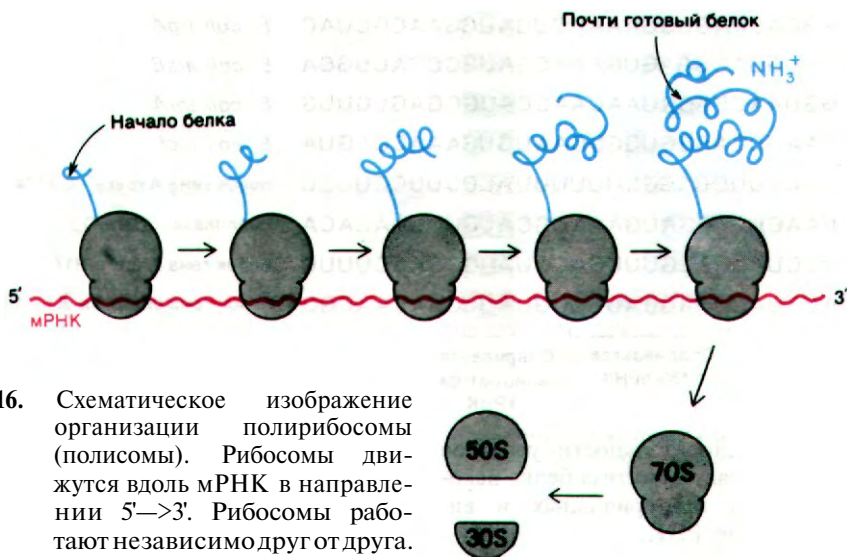


Рис. 27.16. Схематическое изображение организации полирибосомы (полисомы). Рибосомы движутся вдоль мРНК в направлении 5'→3'. Рибосомы работают независимо друг от друга.

новидностям тРНК одна и та же аминокил-тРНК-синтетаза. Затем специальный фермент формилирует аминогруппу метионина, присоединенного к тРНК_f. Донор активированной формильной группы в этой реакции N¹⁰-формилтетрагидрофолат.

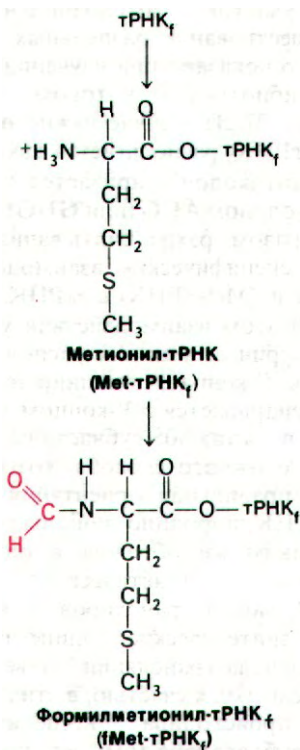


Рис. 27.17. Образование формилметионил-тРНК_f.

27.14. Сигналом инициации служит кодон AUG (или GUG), которому предшествует несколько оснований, способных спариваться с 16S-РНК

Какие структурные особенности мРНК позволяют системе синтеза белка различать кодоны AUG? Первым шагом на пути к решению этого вопроса было выделение инициаторных участков ряда мРНК. Для этого комплексы мРНК с рибосомами, образовавшиеся в условиях, допускающих инициацию, но не элонгацию, расщепляли панкреатической рибонуклеазой. Во всех случаях от расщепления была защищена последовательность длиной около 30 нуклеотидов. Как и предполагалось, каждый из этих иницирующих участков содержал кодон AUG или GUG (рис. 27.18).

Кроме того, каждый участок инициации содержит богатую пуринами последовательность, центр которой находится на расстоянии примерно 10 нуклеотидов в 5'-сторону от иницирующего кодона. Роль этого богатого пуринами участка стала ясна, когда была расшифрована последовательность 16S-РНК. 3'-конец этой рибосомной РНК содержит последовательность из нескольких оснований, комплементарную богатому пурином участку в областях инициации

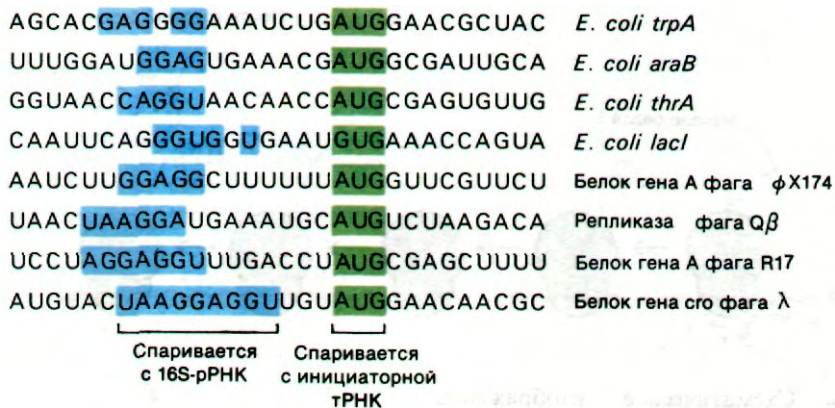


Рис. 27.18. Последовательности участков инициации синтеза белка некоторых бактериальных и вирусных РНК.

мРНК. Из продуктов ферментативного расщепления иницирующего комплекса удалось выделить комплекс 3'-концевого фрагмента 16S-мРНК и области инициации мРНК (рис. 27.19). Последовательности более чем 70 изученных участков инициации показывают, что число пар оснований, которые мРНК образует с 16S-РНК, колеблется от 3 до 9. Интересно, что изменение силы этого взаимодействия дает возможность регулировать эффективность инициации. *Итак, место начала синтеза белка определяется взаимодействиями двух типов: спариванием оснований мРНК с 3'-концом 16S-рРНК и с формилметиониновой инициаторной тРНК.*

27.15. В результате образования иницирующего 70S-комплекса формилметиониновая тРНК связывается с Р-участком

Синтез белка начинается с ассоциации мРНК, рибосомной 30S-субчастицы и формилметиониновой тРНК. Они образуют 30S-комплекс инициации (рис. 27.20). Для образования этого комплекса необходимы ГТР и три белковых фактора, называющихся IF-1, IF-2 и IF-3. Один из этих факторов инициации - IF-3 - участвует в связывании мРНК с 30S-субчастицей. Кроме того, IF-3 препятствует ассоциации 50S- и 30S-субчастиц с образованием непродуктивного 70S-

комплекса без мРНК, а IF-1 и IF-2 способствуют связыванию инициаторной тРНК с комплексом мРНК и 30S-субчастицы.

Затем 50S-субчастица присоединяется к инициаторному 30S-комплексу, образуя инициаторный 70S-комплекс. На этом этапе происходит гидролиз связанного ГТР. 70S-инициаторный комплекс (рис. 27.20) готов к стадии элонгации белкового синтеза. Молекула fMet-тРНК_i занимает Р-участок (пептидильный участок) рибосомы. Второй участок на рибосоме для связывания молекулы тРНК-А-участок (аминоацильный) - еще пуст. Существование отдельных участков Р и А было показано при изучении пуромидина - антибиотика, о котором говорится ниже (разд. 27.21). Сейчас важно отметить, что fMet-тРНК_i располагается таким образом, что антикодон спаривается с иницирующим кодоном AUG (или GUG) в мРНК. Таким образом, рамка считывания устанавливается специфическим взаимодействием рибосомы и fMet-тРНК_i с мРНК. Напомним, что в этом взаимодействии участвует богатый пурином участок, расположенный со стороны 5'-конца от иницирующего кодона. Он спаривается с 3'-концом 16S-РНК, входящей в состав 30S-субчастицы. Выяснение этого сложного способа, которым достигается правильная ориентация инициаторной тРНК, породило любопытную проблему. Каким же образом в опытах по расшифровке генетического кода (разд. 26.3) могли транслироваться poly(U) и другие синтетические полипептиды без сигналов начала трансляции? Ответ заключается в том, что, к счастью, в этих экспериментах происходила неспецифическая трансляция благодаря тому, что концентрация Mg²⁺ в реакционной смеси была выше, чем это имеет место *in vivo*.

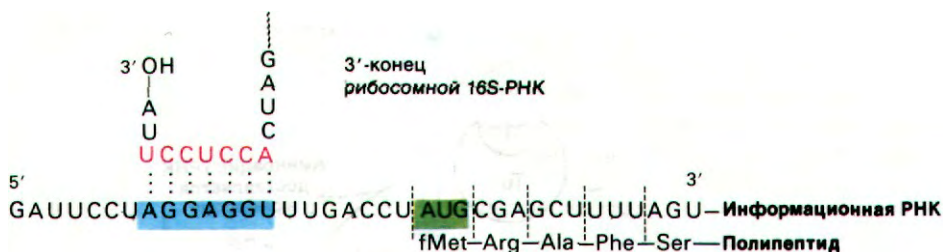


Рис. 27.19. Спаривание богатого пурином участка (показано синим цветом) в области инициации мРНК и 3'-концевого участка 16S-рРНК (красный цвет). Кодон AUG (зеленый цвет) определяет начало полипептидной цепи. Показанная на рисунке мРНК кодирует А-белок фага R17.

27.16. Фактор элонгации Tu доставляет аминоксил-тРНК в А-участок рибосомы
Цикл элонгации белкового синтеза включает три этапа: 1) связывание аминоксил-тРНК (узнавание кодона); 2) образование пептидной связи; 3) транслокация. Цикл начинается с введения аминоксил-тРНК в пустой А-участок рибосомы. Выбор определенной разновидности тРНК зависит от того, какой кодон мРНК находится в А-участке. Комплементарная аминоксил-тРНК доставляется в А-участок белком, который называется фактором элонгации *EF-Tu*. Когда аминоксил-тРНК занимает правильное положение на рибосоме, происходит гидролиз GTP, связанного с *EF-Tu*. GDP остается прочно связанным с *EF-Tu* до тех пор, пока он не вытесняется другим фактором элонгации, а именно *EF-Ts*. Образовавшийся комплекс Tu с Ts распадается при связывании GTP с Tu; новый комплекс Tu-GTP готов для следующего раунда элонгации. Эта ассоциация и диссоциация белков (рис. 27.21) ускоряется и приобретает характер повторяющегося цикла за счет энергии гидролиза GTP.

Важно отметить, что *EF-Tu* не взаимодействует с *fMet-mРНК*. Поэтому инициаторная тРНК не попадает в А-участок. В то же время Met-тРНК_м связывается с *EF-Tu*, подобно всем другим аминоксил-тРНК. Этим и объясняется тот факт, что внутренние кодоны AUG не считаются инициаторной тРНК.

27.17. После образования пептидной связи происходит транслокация

Теперь у нас имеется комплекс, в котором аминоксил-тРНК занимает А-участок,

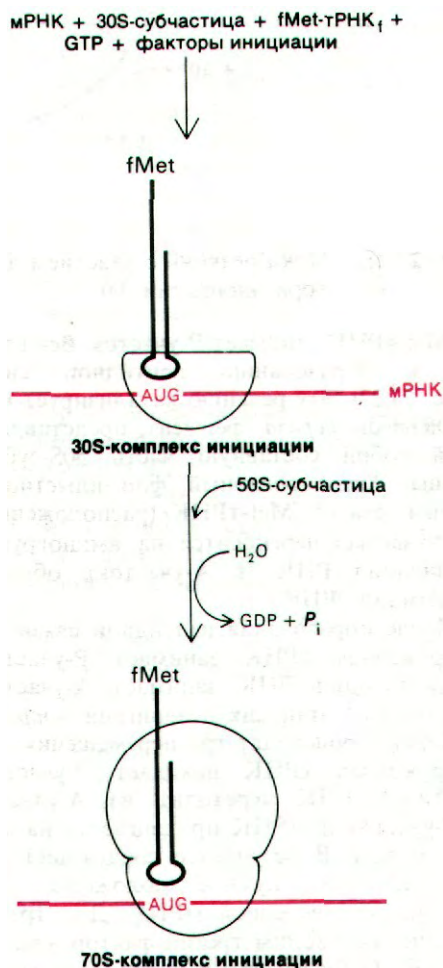


Рис. 27.20. Стадия инициации синтеза белка: образование 30S-комплекса инициации и затем 70S-комплекса инициации.

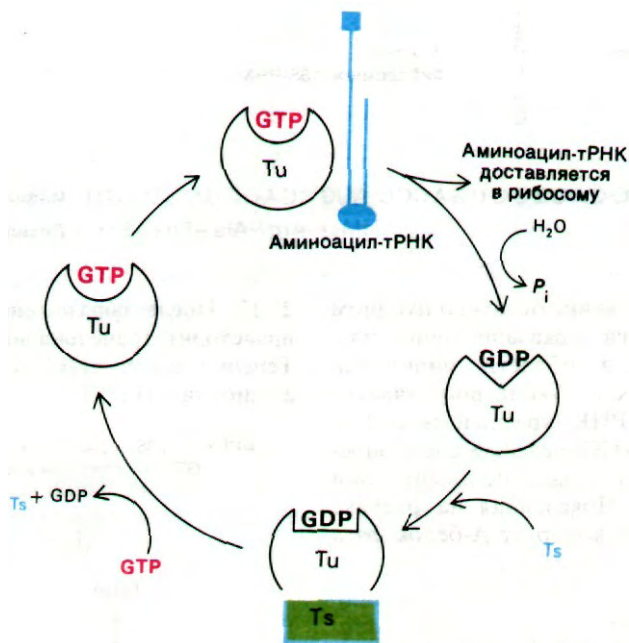


Рис. 27.21. Цикл реакций с участием фактора элонгации Tu.

а fMet-тРНК занимает Р-участок. Все готово к образованию пептидной связи (рис. 27.22). Эту реакцию катализирует *пептидилтрансфераза* - фермент, представляющий собой составную часть 50S-субчастицы. Активированный формилметиониновый остаток fMet-ТРНК_i (расположенной в Р-участке) переносится на аминогруппу aminoacyл-тРНК (в А-участок), образуя дипептидил-тРНК.

После образования пептидной связи ненагруженная тРНК занимает Р-участок, а дипептидил-тРНК занимает А-участок. Следующий этап цикла элонгации - *транслокация*. Происходят три перемещения: ненагруженная тРНК покидает Р-участок, пептидил-тРНК переходит из А-участка в Р-участок и мРНК продвигается на три нуклеотида. В результате следующий кодон занимает нужное положение для считывания очередной мРНК. Для транслокации необходим третий фактор элонгации - EF-G (называемый также *транслоказой*). Во время транслокации происходит гидролиз GTP, связанного с EF-G. Гидролиз GTP обуславливает отделение EF-G от рибосомы. Следовательно, GTP может

действовать каталитически. *Транслокация* - еще один пример направленного движения, энергию для которого обеспечивает гидролиз нуклеозидтрифосфата. После транслокации А-участок освобождается и подготавливается к связыванию aminoacyл-тРНК, чтобы начать новый цикл элонгации (рис. 27.23).

27.18. Синтез белка завершается факторами освобождения

Если А-участок рибосомы занят кодонами UAA, UGA или UAG, то связывания aminoacyл-тРНК обычно не происходит. Нормальные клетки не содержат тРНК с антикодонами, комплементарными сигналам терминации. Их узнают белковые факторы освобождения. Один из этих факторов освобождения - RF-1 - узнает кодоны UAA или UAG. Второй фактор освобождения - RF-2 - узнает UAA или UGA. Таким образом, белки способны узнавать тринуклеотидные последовательности с высокой специфичностью.

Связывание одного из факторов освобождения с терминирующим кодоном в А-участке каким-то образом активирует пептидилтрансферазу, и она гидролизует связь между полипептидом и тРНК в Р-участке. Фактор освобождения изменяет специфичность пептидилтрансферазы таким образом, что акцептором активированного пептидильного остатка становится

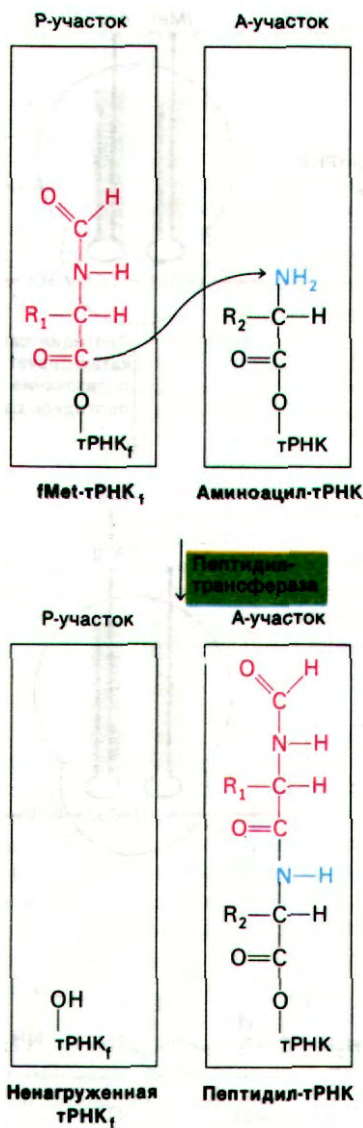


Рис. 27.22. Образование пептидной связи.

H₂O, а не аминогруппа. Затем полипептидная цепь покидает рибосому. 70S-рибосома диссоциирует на 30S- и 50S-субчастицы и приготавливается к синтезу новой белковой молекулы.

27.19. Многие белки модифицируются после трансляции

Многие полипептиды, образующиеся при трансляции мРНК, - еще не окончательные продукты. Они могут быть впоследствии модифицированы различными способами.

1. Формильная группа на N-конце бактериальных белков гидролизуется деформи-

лазой. Под действием *аминопептидазы* может произойти отщепление одного или нескольких N-концевых остатков. И у прокариот, и у эукариот концевой метионин иногда отщепляется в то время, когда синтез остальной полипептидной цепи еще продолжается.

2. При окислении двух цистеиновых остатков могут образоваться *дисульфидные связи*.

3. Боковые цепи некоторых аминокислот могут быть специфически модифицированы. Например, некоторые остатки пролина и лизина в коллагене *гидроксилируются*. Гликопротеины образуются путем присоединения сахаров к боковым цепям аспарагина, серина и треонина. Некоторые белки *фосфорилируются*. К ферментам ковалентно присоединяются *простетические группы*, например липоевая кислота.

4. Полипептидные цепи могут подвергаться специфическому *расщеплению*, например при превращении проколлагена в коллаген и проинсулина в инсулин. Трансляция мРНК вируса полиомы дает очень длинную полипептидную цепь, которая гидролизуетсся с образованием нескольких белков.

27.20. Стрептомицин ингибирует инициацию и вызывает неправильное считывание информационной РНК

Мы уже видели, что антибиотики - чрезвычайно важный инструмент в биохимических исследованиях, так как действие многих антибиотиков весьма специфично. Например, рифампицин - мощный ингибитор инициации синтеза РНК (разд. 25.18). Известно много антибиотиков, ингибирующих синтез белка (табл. 27.3). В случае некоторых из них установлен и механизм действия. *Стрептомицин* - сильно основной трисахарид - препятствует связыванию формилметионил-тРНК с рибосомами и нарушает таким образом правильную инициацию белкового синтеза. Кроме того, стрептомицин вызывает неправильное считывание мРНК. Если в качестве матрицы используется poly(U), то наряду с включением фенилаланина (UUU) происходит включение изолейцина (AUU). Место действия стрептомицина в рибосоме было определено в результате опытов по реконструкции компонентов рибосом из чув-

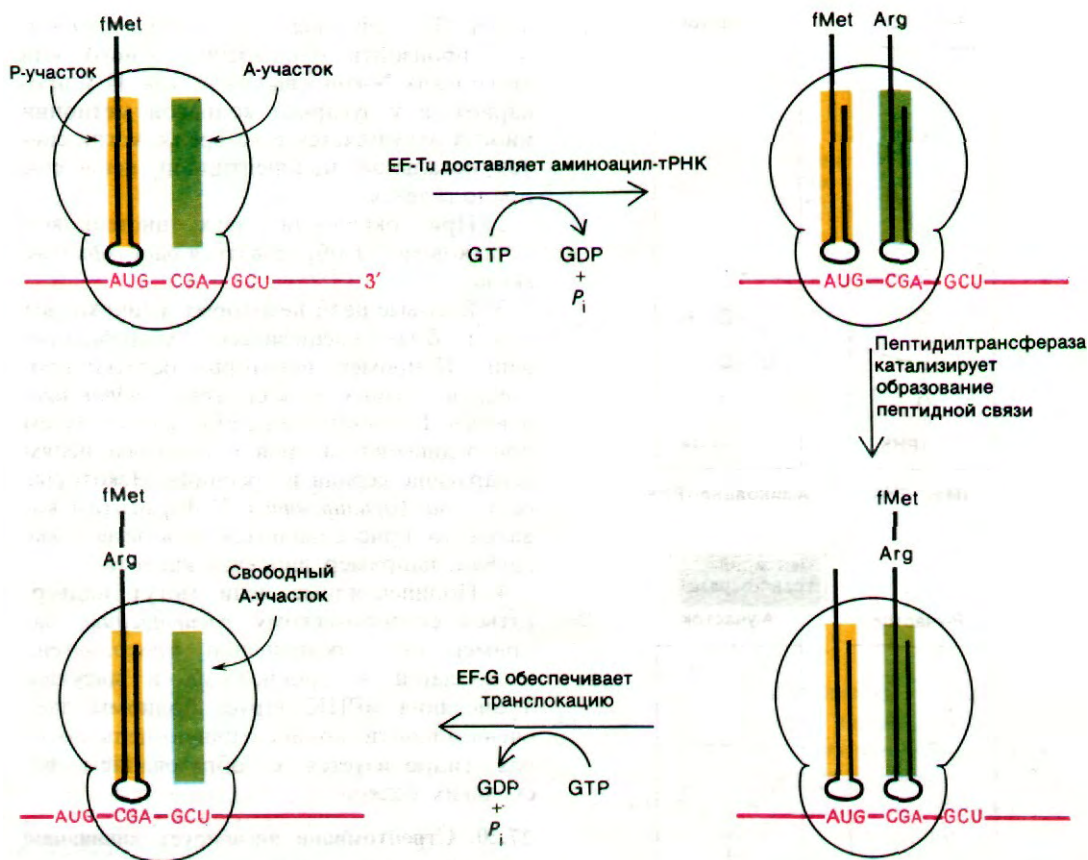


Рис. 27.23. Стадия элонгации синтеза белка: связывание аминоксил-тРНК, образование пептидной связи и транслокация.

ствительных и устойчивых к стрептомицину бактерий. Такие штаммы бактерий различаются мутацией в единственном гене. Чем же различаются эти рибосомы? Поскольку рибосомы можно диссоциировать и реконструировать *in vitro*, представлялась возможность выяснить, где расположен детерминант чувствительности к стрептомицину - в 50S- или 30S-субчастице. Гибридные рибосомы из 50S-субчастиц устойчивых бактерий и 30S-субчастиц чувствительных бактерий оказались чувствительными к стрептомицину, а рибосомы, полученные из субчастиц в обратной комбинации, устойчивы к нему. Этот эксперимент показал, что детерминант чувствительности к стрептомицину локализован в 30S-суб-

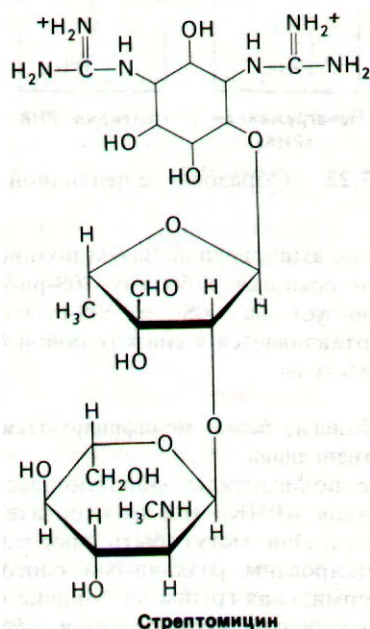


Таблица 27.3. Антибиотики - ингибиторы синтеза белка

Антибиотик	Действие
Стрептомицин	Ингибирует инициацию и вызывает неправильное считывание мРНК (у прокариот)
Тетрациклин	Связывается с 30S-субчастицей и ингибирует связывание аминокил-тРНК (у прокариот)
Хлорамфеникол	Ингибирует пептидилтрансферазную активность 50S-субчастицы рибосом (у прокариот)
Циклогексимид	Ингибирует пептидилтрансферазную активность 60S-субчастицы рибосом (у эукариот)
Эритромицин	Связывается с 50S-субчастицей и ингибирует транслокацию (у прокариот)
Пуромицин	Вызывает преждевременную терминацию цепи, действуя в качестве аналога аминокил-тРНК (у прокариот и эукариот)

частице. Следующий эксперимент продемонстрировал, что чувствительность к стрептомицину определяется каким-то белком 30S-субчастицы, а не молекулой 16S-РНК. Наконец, после ряда сложных экспериментов оказалось, что чувствительность к стрептомицину детерминруется только одним белком, входящим в состав 30S-субчастицы S12.

27.21. Пуромицин вызывает преждевременную терминацию цепи, так как имитирует аминокилированную транспортную РНК

Антибиотик пуромицин ингибирует синтез белка, поскольку он освобождает новообразованные полипептидные цепи еще до того, как завершается их синтез. Пуромицин-аналог концевой участка аминокил-тРНК аминокиладенозина (рис. 27.24). Он связывается с А-участком рибосомы и препятствует связыванию аминокил-тРНК. Кроме того, пуромицин содержит α -аминогруппу. Эта аминогруппа, подобно аминогруппе аминокил-тРНК, образует пептидную связь с карбоксильной группой растущей пептидной цепи в результате реакции, катализируемой пептидилтрансферазой. Образующийся продукт представляет собой пептид с ковалентно присоединенным остатком пуромицина на карбоксильном конце. Затем пептидилпуромицин сходит

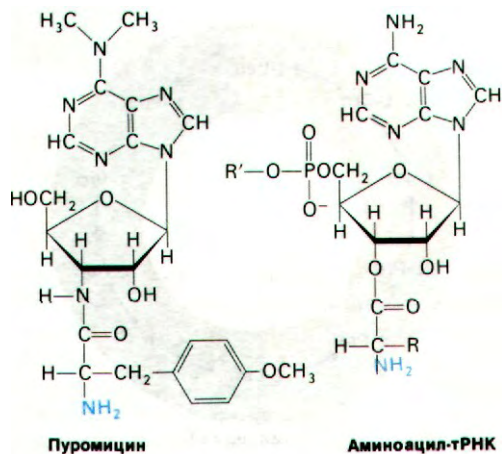


Рис. 27.24. Структура пуромицина имитирует аминокилированный конец аминокил-тРНК.

с рибосомами. Пуромицин был использован для изучения функционального состояния рибосом. Концепция существования А- и Р-участков возникла в результате опытов с использованием пуромицина для выяснения локализации пептидил-тРНК. Когда пептидил-тРНК находится в А-участке (до транслокации), она не может вступать в реакцию с пуромицином.

27.22. Некоторые короткие пептиды синтезируются без участия рибосом

Теперь мы перейдем к другому механизму образования пептидной связи в биологических системах. Рассмотрим в качестве примера биосинтез грамицидина S - циклического пептидного антибиотика, состоящего из двух идентичных пентапептидов, соединенных «голова к хвосту» (рис. 27.25). Этот антибиотик продуцируют некоторые штаммы спорообразующей бактерии *Bacillus brevis*.

Биосинтез грамицидина S происходит в отсутствие рибосом или мРНК. Для него необходим гораздо более простой синтетический аппарат, состоящий всего лишь из двух ферментов - E_I и E_{II} . Фермент E_{II} (масса 100 кДа) активирует фенилаланин, остальные четыре аминокислоты пентапептидного фрагмента активируются E_I (масса 180 кДа). Кроме того, оба фермента уча-

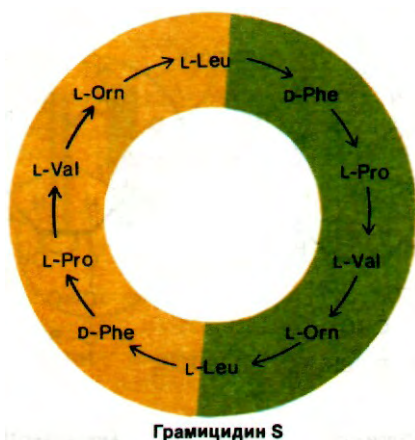
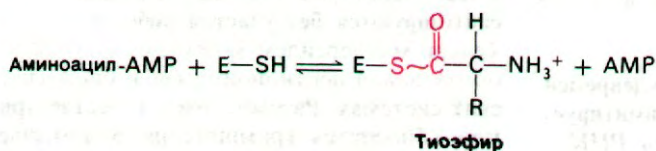


Рис. 27.25. Последовательность аминокислот в грамицидине S, циклическом пептиде, состоящем из двух одинаковых пентапептидных групп.

ствуют в образовании пептидной связи.

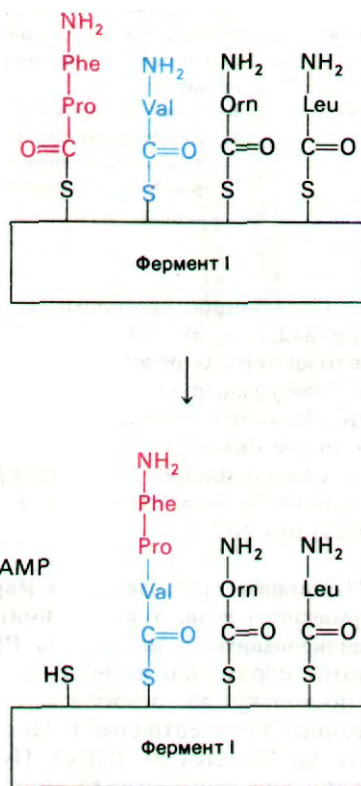
В этой системе аминокислоты активируются путем образования *тиоэфиров*, связанных с ферментами. Вместо 3'-концевой гидроксильной группы тРНК активированные аминокислоты присоединяются к сульфгидрильной группе E_I и E_{II} :



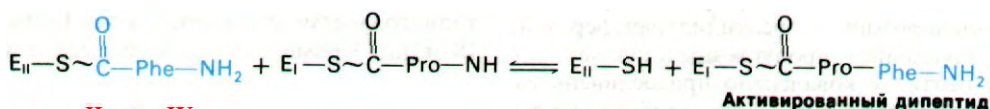
Если инкубировать L-пролин, L-валин, L-орнитин и L-лейцин с E_I в присутствии АТФ, они образуют тиоэфирные связи с определенными сульфгидрильными группами E_I . Точно так же D-фенилаланин в присутствии АТФ образует тиоэфирную связь с E_{II} .

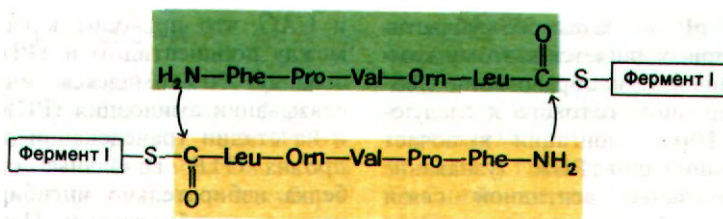
Синтез пептида в этой системе инициируется взаимодействием E_I и E_{II} . Остаток D-фенилаланина, присоединенный к E_{II} ,

переносится на иминогруппу L-пролинового остатка, присоединенного к E_I , с образованием дипептида. В последующих реакциях участвует только E_I . Активированная карбонильная группа остатка пролина в составе дипептида реагирует с аминогруппой валинового остатка, прикрепленного к тому же ферменту, и дает трипептид. Этот процесс повторяется с участием орнитина и затем лейцина, образуя в результате пентапептид, связанный с ферментом. С возникновением каждой новой пептидной связи растущий пептид переносится на новую сульфгидрильную группу. Нако-



нец, активированные пентапептиды, присоединенные к двум различным молекулам E_I , реагируют друг с другом с образованием циклического грамицидина S.





Следует отметить две особенности этого биосинтетического пути.

1. Аминокислотная последовательность грамицидина S определяется пространственной организацией и специфичностью ферментов E_I и E_{II} . На каждую пептидную связь приходится по меньшей мере одна субъединица белка. Выходит, что *этот способ синтеза уступает по экономичности рибосомному механизму. Поэтому пептиды, содержащие более чем примерно 15 остатков, не синтезируются с помощью этого механизма.*

2. Синтез грамицидина S напоминает синтез жирных кислот в том отношении, что активированными промежуточными продуктами в обоих процессах служат тиоэфиры. Кроме того, E_I содержит ковалентно связанный остаток фосфопантетина. Возможно, этот тиол переносит растущую пептидную цепь с одного участка E_I на следующий. Фриц Липман (Fritz Lipmann) предположил, что *синтез полипептидных антибиотиков, возможно, представляет собой как бы атавизм, напоминающий о примитивном механизме синтеза белка, который использовался на заре эволюции.* Синтез рибосомных белков мог возникнуть в результате эволюции синтеза жирных кислот.

Закключение

Синтез белка (трансляция) зависит от координированного взаимодействия более чем 100 макромолекул, к которым, помимо рибосом, относятся мРНК, тРНК, активирующие ферменты и белковые факторы. Синтез белка начинается с активации аминокислот аминокил-тРНК-синтетазами (активирующими ферментами) за счет энергии АТФ. Синтетазы соединяют карбоксильную группу аминокислоты с 2'- или 3'-гидроксильной группой остатка аденозина на 3'-конце тРНК. Для каждой аминокислоты имеется по меньшей мере один активирующий фермент. Кроме того, для каждой аминокислоты имеется хотя бы од-

на специфическая тРНК. Все транспортные РНК, обладающие различной специфичностью, характеризуются общим планом строения. Это - одиночные цепи РНК длиной примерно 80 нуклеотидов, содержащие некоторые модифицированные (например, метилированные) производные обычных оснований. Последовательности оснований всех известных тРНК могут быть написаны в виде клеверного листа, в котором примерно половина нуклеотидов спарена. Кристаллографические исследования с помощью рентгеновских лучей показали, что молекула тРНК имеет L-образную форму. На одном конце L-образной структуры находится 3'-концевая ССА-последовательность, являющаяся местом присоединения аминокислоты, на другом конце, на расстоянии около 80А, - антикодон. Информационная РНК узнает антикодон тРНК, а не присоединенную к тРНК аминокислоту. Кодон мРНК образует пары оснований с антикодоном тРНК. Некоторые тРНК узнают более одного кодона благодаря тому, что спаривание третьего основания кодона менее избирательно, чем спаривание двух других (гипотеза «качаний», неоднозначного соответствия; wobble-hypothesis). Синтез белка происходит на рибосомах, образованных из больших и малых субъединиц. В каждом из них примерно две трети массы приходится на долю РНК и одна треть - на белок. 70S-рибосома *E.coli* (масса 2500 кДа) состоит из 30S- и 50S-субчастиц.

Синтез белка происходит в три этапа, называемых соответственно инициацией, элонгацией и терминацией. Информационная РНК, формилметионил-тРНК_i и 30S-субчастица рибосомы соединяются, образуя 30S-комплекс инициации. Сигналом начала трансляции служит кодон AUG (или GUG), которому предшествует богатая пурином последовательность, способная спа-

риваться с 16S-pPHK. Затем 50S-субчастица рибосомы присоединяется к этому комплексу, что приводит к образованию 70S-комплекса инициации, готового к следующему этапу. Цикл элонгации включает связывание аминоксил-тPHK (узнавание кодона), образование пептидной связи и транслокацию. Рост цепи происходит в направлении от N-конца к С-концу. Терминацию синтеза белка осуществляют факторы освобождения, которые узнают терминирующие кодоны UAA, UGA

и UAG, что приводит к гидролизу связи между полипептидом и тPHK. При образовании 70S-комплекса инициации, при связывании аминоксил-тPHK с рибосомой и на стадии транслокации происходит гидролиз GTP. Различные стадии синтеза белка избирательно ингибируются токсинами и антибиотиками. Пептидные антибиотики и другие короткие полипептиды синтезируются без рибосом, причем механизм их образования напоминает синтез жирных кислот.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Miller O.L., Jr., 1973. The visualization of genes in action, *Sci. Amer.*, **228**(3), 34-42.

Rich A., Kim S.H., 1978. The three-dimensional structure of transfer RNA, *Sci. Amer.*, **238**(1), 52-62.

Clark B.F.C., Marcher K.A., 1968. How proteins start, *Sci. Amer.*, **218**(1), 36-42.

Книги, посвященные синтезу белка
Weissbach H., Pestka S. (eds.), 1977. *Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis*, Academic Press. (Содержит статьи о синтетазах, структуре и функции рибосом, инициации, элонгации, транслокации, терминации и антибиотиках-ингибиторах белкового синтеза.)

Cold Spring Harbor Laboratory, 1969. *Mechanisms of Protein Biosynthesis* (Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, vol. 34).

Рибосомы

Nomura M., Tissieres A., Lengyel P. (eds.) 1975. *Ribosomes*, Cold Spring Harbor Laboratory. (Содержит великолепные статьи о структуре, функции и сборке рибосом.)
Brimacombe K., Staffer G., Wittmann H.G., 1978. Ribosome structure, *Ann. Rev. Biochem.*, **47**, 217-249.
Wittman H.G., 1977. Structure and function of *Escherichia coli* ribosomes, *Fed. Proc.*, **36**, 2025-2080.
Nomura M., 1973. Assembly of bacterial ribosomes, *Science*, **179**, 864-873.

Транспортная PHK

Schimmel P., Soil D., Abelson J. (eds.) 1979. *Transfer RNA*. Cold Spring Harbor Laboratory. (В части I рассмотрены структура, свойства и узнавание, а в части II - биосинтез и генетика тPHK. Авторитетный и содержательный труд.)

Kim S.-H., 1978. Three-dimensional structure of transfer RNA and its functional implications, *Advan. Enzymol.*, **46**, 279-315.

Jack A., Ladner J.E., Klug A., 1976. Crystallographic refinement of yeast phenylalanine transfer RNA at 2.5 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, **108**, 619-649.

Sussman J.L., Kim S.-H., 1976. Three-dimensional structure of a transfer RNA in two crystal forms, *Science*, **192**, 853-858.

Аминоксил-тPHK синтетазы

Schimmel P.R., Soil D., 1979. Amino acyl-tRNA synthetases: general features and recognition of transfer RNAs, *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 601-648.

Инициация, элонгация и терминация

Dintzis H.M., 1961. Assembly of the peptide chains of hemoglobin, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **47**, 247-261. (Важные эксперименты по импульсной метке, показавшие, что белки синтезируются в направлении от аминоконца к карбоксильному концу.)

Steitz J.A., 1979. Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA. In: *Goldberger R.F. (ed.)*, *Biological Regulation and Development*, vol. I, pp. 349-399, Plenum.

Shine J., Dalgarno L., 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity

to nonsense triplets and ribosome binding sites, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **71**, 1342-1346.

Steitz J.A., Jakes K., 1975. How ribosomes select initiator regions in mRNA: base pair formation between the 3'-terminus of 16S rRNA and the mRNA during initiation of protein synthesis in *Escherichia coli*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **72**, 4734-4738.

Gupta S.L., Waterson J., Sopori M., Weissman S.M., Lengyel P., 1971. Movement of the ribosome along the messenger ribonucleic acid during protein synthesis, *Biochemistry*, **10**, 4410-4421.

Kaziro Y., 1978. The role of GTP in polypeptide chain elongation, *Biochim. Biophys. Acta*, **505**, 95-127.

Надежность трансляции

Fersht A., Dingwall C., 1979. Evidence for the double-sieve editing mechanism in protein biosynthesis, *Biochemistry*, **18**, 2627-2631.

Антибиотики и токсины

Pestka S., 1971. Inhibitors of ribosome function, *Ann. Rev. Microbiol.*, **25**, 487-562.

Jimenez A., 1976. Inhibitors of translation, *Trends Biochem. Sci.*, **1**, 28-29.

Tai P.-C., Wallace B.J., Davis B.D., 1978. Streptomycin causes misreading of natural messenger by interacting with ribosomes after initiation, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **75**, 275-279.

Нерибосомный синтез пептидов

Lipmann F., 1971. Attempts to map a process evolution of peptide biosynthesis, *Science*, **17**, 875-884.

Perlman D., Bondanszky M., 1971. Biosynthesis of peptide antibiotics, *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 449-464.

Lipmann F., 1973. Nonribosomal polypeptide synthesis on polyezyme templates, *Ace. Chem. Res.*, **6**, 361-367.

Вопросы и задачи

1. Образование Пс-тРНК происходит через связанный с ферментом промежуточный продукт Пс-АМР. Будет ли, по вашему мнению, образовываться ^{32}P -меченный АТР из $^{32}\text{PP}_i$, если инкубировать каждый из следующих наборов компонентов в присутствии специфического активирующего фермента?

- АТР и $^{32}\text{PP}_i$.
- тРНК, АТР и $^{32}\text{PP}_i$.
- Изолейцин, АТР и $^{32}\text{PP}_i$.

2. Из бактерий, выращенных на «тяжелой» (содержащей ^{15}C и ^{15}N) и на «легкой» (^{12}C и ^{14}N) среде, получили рибосомы. Эти 70S-рибосомы добавили в систему с активным синтезом белка *in vitro*. Через несколько часов из смеси отобрали пробу и проанализировали ее центрифугированием в градиенте плотности. Сколько полос 70S-рибосом вы ожидаете увидеть в градиенте плотности?

3. Сколько богатых энергией фосфатных связей затрачивается на синтез белка из 200 остатков, если исходить из готовых аминокислот?

4. Существует два основных механизма элонгации биологических молекул (рис. 27.26). 1-й механизм основан

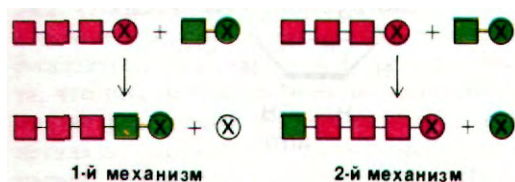


Рис. 27.26. Два механизма элонгации.

на отщеплении активирующей группы (помеченной на рисунке крестиком) от растущей цепи. При синтезе по 2-му механизму

активирующая группа отщепляется от присоединяющегося к растущей цепи мономера. Укажите, по какому из механизмов, 1-му или 2-му, протекают следующие реакции биосинтеза.

- Синтез гликогена.
- Синтез жирных кислот.
- $\text{C}_5 \rightarrow \text{C}_{10} \rightarrow \text{C}_{15}$ при синтезе холестерина.
- Синтез ДНК.
- Синтез РНК.
- Синтез белка.

5. Мутации, в результате которых возникают терминирующие кодоны, называются нонсенс-мутациями. Эти мутации могут быть супрессированы измененными тРНК. Например, мутантная РНК считывает кодон UGA как триптофановый кодон. Какое наиболее вероятное замещение основания произошло в этой мутантной тРНК?

6. Придумайте реактив для ковалентного мечения по сродству участков связывания тРНК в рибосоме. Как бы вы синтезировали такой реактив?

7. мРНК-транскрипт одного гена фага Т7 содержит следующую последовательность оснований:



Предскажите, к какому результату приведет мутация отмеченного стрелкой G при его замене на А.

8. Что общего между коррекцией ошибок при синтезе белка и ДНК?

Дополнительные вопросы см.: Wood W. B., Wilson J. H., Benbow R. M., Hood L. E., Biochemistry: A Problems Approach, Benjamin, 1974, ch. 18.

ГЛАВА 28

Регуляция выражения гена в фенотипе

Мы уже видели, что активность многих белков регулируется с помощью различных механизмов, например протеолитической активации, аллостерических взаимодействий и ковалентной модификации. В этой главе рассматривается *регуляция скорости синтеза белка*, которая также играет принципиально важную роль в общей картине метаболизма клетки. У бактерий активность гена регулируется в основном на уровне *транскрипции*, а не трансляции. Мы сосредоточим внимание на лактозном и триптофан-

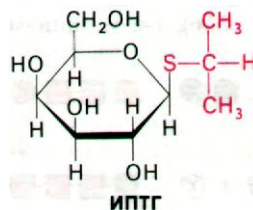


новом оперонах *E. coli* и на регуляторных аспектах цикла развития бактериофага λ , так как молекулярные механизмы регуляции в этих системах хорошо изучены. Более того, именно интенсивное исследование этих систем позволило сформулировать некоторые общие принципы регуляции выражения гена в фенотипе (экспрессии гена) у прокариот и вирусов. Экспрессия гена у эукариот регулируется иначе, как это станет очевидно из следующей главы.

28.1. β -Галактозидаза - индуцибельный фермент

E. coli может использовать лактозу в качестве единственного источника углерода.

Главный фермент в метаболизме этого сахара - β -галактозидаза, гидролизующая лактозу на галактозу и глюкозу (рис. 28.1). При выращивании на лактозе клетка *E. coli* содержит несколько тысяч молекул β -галактозидазы. Если же выращивать *E. coli* на других источниках углерода, например на глюкозе или глицероле, то число молекул β -галактозидазы на клетку не достигает десяти. Лактоза индуцирует значительное увеличение количества β -галактозидазы в клетке *E. coli*, причем она вызывает синтез новых молекул фермента, а не активирует профермент (рис. 28.2). Следовательно, β -галактозидаза - индуцибельный фермент. Одновременно и согласованно с β -галактозидазой синтезируются еще два белка - галактозид-



пермеаза и тиогалактозид-трансацилаза. Пермеаза необходима для переноса лактозы через бактериальную клеточную мембрану, трансацилаза же не имеет существенного значения для метаболизма лактозы. Физиологическая роль трансацилазы пока не установлена, *in vitro* она катализирует перенос ацетильной группы ацетил-СоА на гидроксильную группу при С-6 тиогалактозида.

Физиологическим индуктором β -галактозидазы является *аллолактоза*, которая образуется из лактозы в результате реакции трансгликозилирования. Синтез аллолактозы катализируется теми несколькими молекулами β -галактозидазы, которые имеются в клетке еще до индукции. Изучение природы индукторов показало, что некоторые β -галактозиды служат индукторами,

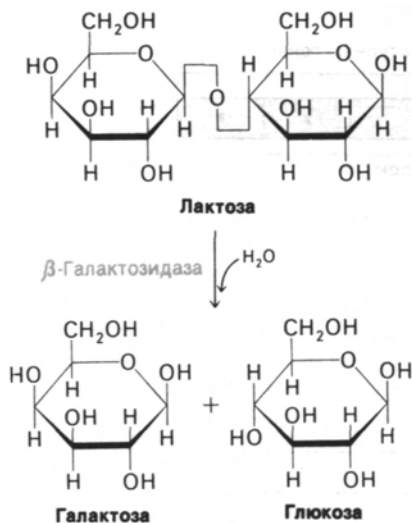


Рис. 28.1. β -Галактозидаза гидролизует лактозу.

не являясь при этом субстратами β -галактозидазы, тогда как другие соединения ведут себя как субстраты, не будучи при этом индукторами. Например, *изопропилтиогалактозид* (ИПТГ) неметаболизируемый индуктор (его также называют холостым индуктором).

28.2. Открытие регуляторного гена

Ключом к изучению механизма индукции β -галактозидазы стало открытие того факта, что под действием всех исследованных индукторов количество пермеазы и трансацилазы возрастало прямо пропорционально количеству β -галактозидазы. Дальнейший прогресс был достигнут при изучении мутантов. Оно показало, что β -галактозидаза, пермеаза и трансацилаза кодируются тремя генами - z , y и a соответственно - которые расположены друг за другом. Были получены мутанты, утратившие способность к синтезу одного из этих белков. Например, генотип $z^-y^+a^+$ обозначает, что у данного мутанта нет β -галактозидазы, но имеются в нормальном количестве пермеаза и трансацилаза. Наибольший интерес представляет класс мутантов, у которого мутацией затронуты все три белка. Такие *конститутивные мутанты* синтезируют без всякого индуктора большие количества β -галактозидазы, пермеазы и трансацилазы. Франсуа Жакоб и Жак Моно (Francois Jacob, Jacques Monod) пришли к выводу, что *скорость синтеза этих трех белков зависит*

от какого-то общего элемента, отличного от генов, кодирующих их последовательно. Ген этого общего регуляторного элемента был обозначен i . Индуцибельные бактерии дикого типа имеют генотип $i^+z^+y^+a^+$, а конститутивные мутанты по лактозным генам - генотип $i^-z^+y^+a^+$.

Каким образом осуществляется влияние гена i на скорость синтеза белков, кодируемых генами z , y и a ? Проще всего было предположить, что ген i кодирует синтез некоего компонента цитоплазмы, названного *репрессором*, которого либо совсем нет в i^- -клетках, либо он там неактивен. Эта идея была проверена в ряде изящных генетических экспериментов с частично диплоидными бактериями, имевшими два набора генов лактозной области. Один набор содержался в бактериальной хромосоме, а второй - в половом факторе F' , введенном в клетку при конъюгации. Например, был получен диплоид i^+z^-/Fi^-z^+ . У этого диплоида гены i^+z^- находятся в хромосоме, а гены i^-z^+ - в эписоме. Является ли этот диплоид индуцибельным или конститутивным в отношении β -галактозидазы? Другими словами, может ли ген i^+ бактериальной хромосомы подавлять экспрессию гена z^+ , расположенного в эписоме? Эксперимент дал совершенно



Рис. 28.2. Увеличение количества β -галактозидазы идет параллельно увеличению числа клеток в растущей культуре *E.coli*. Наклон этого графика указывает, что β -галактозидаза составляет 6,6% всего синтезируемого белка.

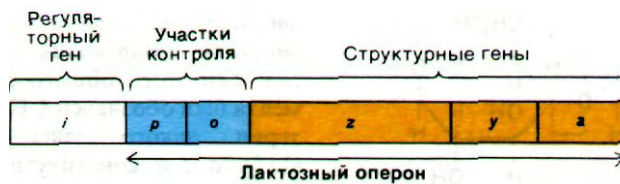


Рис. 28.3. Карта лактозного оперона и его регуляторного гена. В карте масштаб не соблюден: участки *p* и *o* в действительности гораздо меньше, чем кодирующие участки генов.

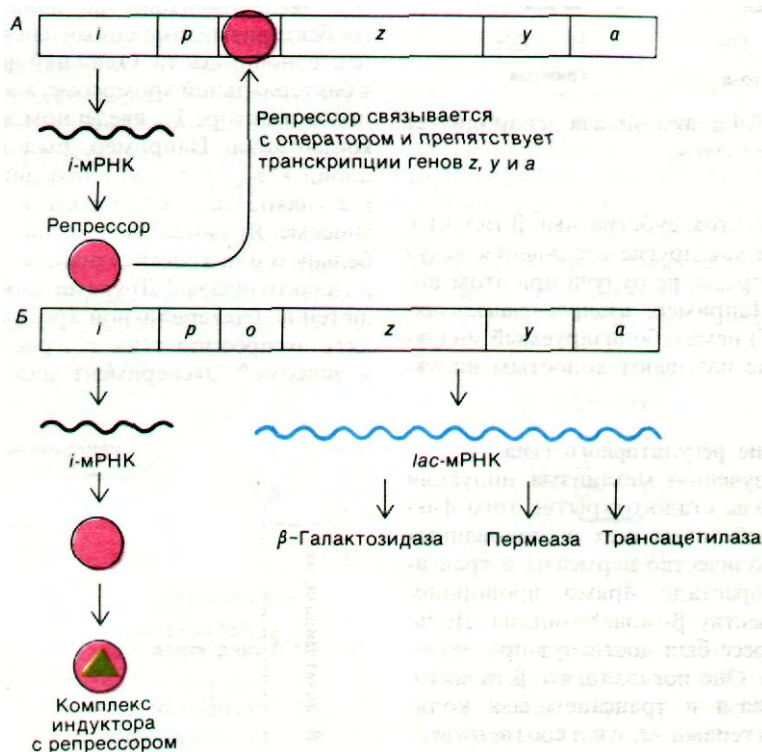


Рис. 28.4. Схема лактозного оперона в репрессированном (А) и индуцированном (Б) состояниях.

четкий результат: диплоид индуцибелен, а не конститутивен. Такой же результат был получен и в отношении диплоида $i^- z^+ / Fi^+ z^-$. Следовательно, ген *i* кодирует способный к диффузии репрессор.

28.3. Оперон - единица координированной генетической экспрессии

На основе только что описанных экспериментов Жакоб и Моно постулировали модель оперона, объясняющую регуляцию белкового синтеза. Генетические элементы этой модели - регуляторный ген, операторный ген и набор структурных генов (рис. 28.3). Регуляторный ген продуцирует репрессор, который может взаимодействовать с операторным геном. В дальнейшем выяснилось, что репрессор представляет собой белок. Операторный ген расположен рядом по соседству со структурными генами, которые

он контролирует. Связывание репрессора с операторным геном препятствует транскрипции структурных генов. Операторный ген в совокупности со структурными генами, рядом с которыми он расположен, называется *опероном*. В случае лактозного оперона ген *i* - регуляторный ген, ген *o* - ген-оператор, а гены *z*, *y* и *a* - структурные гены. Кроме того, существует еще *промоторный участок* (обозначаемый символом *p*) для связывания РНК-полимеразы. Этот участок инициирования транскрипции расположен перед операторным геном. *Индуктор*, например изопропилтиогалактозид (ИПТГ), связывается с репрессором и тем самым нарушает его взаимодействие с операторным геном. Теперь гены *z*, *y* и *a* могут транскрибироваться. При этом образуется одна длинная молекула РНК, кодирующая все три белка (рис. 28.4). Молекулу мРНК, кодирующую более одного белка, называют *полицистронным* (или *полигенным*) *транскриптом*.

28.4. *lac*-Репрессор - тетрамерный белок

При выделении репрессора лактозного оперона (*lac*-репрессор) была использована его



Рис. 28.5. Электронная микрофотография *lac*-репрессора, связанного с ДНК, содержащей *lac*-оператор. (Печатается с любезного разрешения д-ра Jack Griffith.)

способность связываться с ИПТГ. Уолтер Гилберт и Бенно Мюллер-Хилл (Walter Gilbert, Benno Muller-Hill) установили, что *lac*-репрессор - белок, который связывается с ДНК, содержащей *lac*-оперон, но не связывается ни с одной другой ДНК. Как и предполагалось, ИПТГ подавляет связывание *lac*-репрессора с *lac*-операторной ДНК. Клетка *E. coli* дикого типа содержит всего около десяти молекул *lac*-репрессора. При очистке репрессора возникли трудности, связанные с тем, что он составляет всего 0,001% общего содержания белка. Однако существуют *i^{sq}*-мутанты, имеющие, по-видимому, более эффективный промотор гена *i*. У этих мутантов образуется гораздо больше *lac*-репрессора. Количество *lac*-репрессора увеличивается еще сильнее, если использовать трансдуцирующие фаги, несущие область *lac*. Зараженные таким фагом клетки *E. coli* содержат около 20 000 молекул репрессора (примерно 2% всего белка). Это прекрасный исходный материал для выделения *lac*-репрессора.

Репрессор - тетрамер из идентичных субъединиц с массой 37 кДа, каждая из которых имеет один участок связывания с индуктором. Константа диссоциации ИПТГ составляет примерно 10^{-6} М. Репрессор очень прочно и быстро связывается с оператором. Константа диссоциации комплекса репрессор-оператор составляет примерно 10^{-13} М. Такое высокое сродство обусловлено тем, что в клетке *E. coli* дикого типа содержится всего несколько молекул репрессора. Константа скорости ассоциации поразительно высока - $7 \cdot 10^9$ м⁻¹ · с⁻¹. Из этого следует, что репрессор находит операторный участок, диффундируя вдоль молекулы ДНК (одномерный поиск), а не ищет его, находясь в водной среде (трехмерный поиск)¹.

28.5. Последовательность оснований в *lac*-операторе симметрична

Наличие чистого *lac*-репрессора сделало возможным выделение *lac*-оператора

¹ Недавно проведенные исследования показали, что ситуация намного сложнее: поиск оператора репрессором включает оба указанных механизма и в очень большой степени зависит от ионного состава среды. - Прим. перев.

28. Регуляция выражения гена в фенотипе

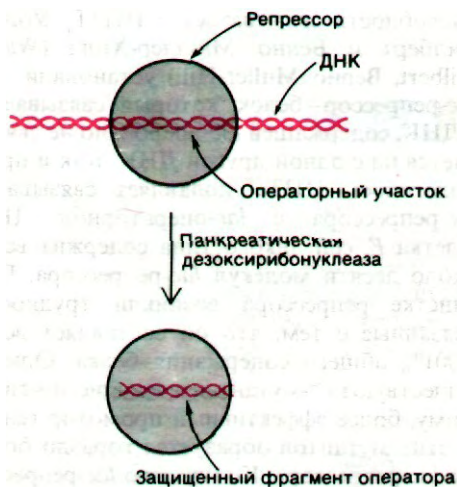


Рис. 28.6. *lac*-Репрессор защищает *lac*-оператор от расщепления панкреатической дезоксирибонуклеазой.

и определение его последовательности оснований. Гилберт и его сотрудники, воздействуя ультразвуком на ДНК фага, содержащего *lac*-область, получили фрагменты длиной примерно 1000 пар оснований. К смеси фрагментов добавили *lac*-рспрессор и затем профильтровали раствор через нитроцеллюлозную мембрану. Фрагменты ДНК, не связанные с *lac*-репрессором, прошли через фильтр, а комплексы ДНК-репрессор прочно связались с ним. Связанную ДНК сняли с фильтра с помощью ИПТГ. Эти элюированные фрагменты ДНК обработали панкреатической дезоксирибонуклеазой в присутствии репрессора. Идея этого этапа эксперимента состояла в том, что операторный участок, связанный в комплексе с репрессором, должен быть защищен от расщепления дезоксирибонуклеазой (рис. 28.6). Затем установили последовательность оснований этих операторных фрагментов, определив последовательность транскрибированной с этих фрагментов РНК. Последовательность оснований этого участка оказалась очень интересной: 28 пар оснований расположено симметрично относительно оси второго порядка (рис. 28.7). Симметрия репрессора, по-видимому, соответствует симметрии оператора. Этот принцип узнавания приложим также к сиг-

налам терминирования транскрипции (разд. 28.8) и к связыванию пептидного антибиотика актиномицина D с ДНК (разд. 25.18)¹.

28.6. Циклический АМР стимулирует транскрипцию многих индуцибельных катаболических оперонов

Давно уже известно, что в клетках *E. coli*, растущих на глюкозе, активность катаболических ферментов, таких, как β -галактозидаза, галактокиназа, арабинозо-изомеразы и триптофаназа, находится на очень низком уровне. Очевидно, было бы совершенно излишним синтезировать эти ферменты в условиях изобилия глюкозы². Молекулярный механизм такого ингибирующего действия глюкозы, получивший название *катаболитная репрессия*, был расшифрован. Ключом к выяснению этого вопроса явились данные о том, что глюкоза понижает концентрацию циклического АМР в клетках *E. coli*. Затем обнаружилось, что экзогенный циклический АМР снимает состояние репрессии, обусловленное присутствием глюкозы. Последующие биохимические и генетические исследования показали, что *циклический АМР стимулирует иницирование транскрипции многих индуцибельных оперонов*.

Циклический АМР, синтезированный в отсутствие глюкозы, связывается с БАК (*белковый активатор катаболизма*) - белком, представляющим собой димер из субъединиц массой 22 кДа. *Комплекс БАК с циклическим АМР стимулирует транскрипцию, связываясь вблизи от многих промоторных участков; БАК без АМР такой способностью не обладает*. Опытами по расщеплению дезоксирибонуклеазой было установлено, что в случае *lac*-оперона БАК связывается рядом с участком связывания РНК-полимеразы. Точнее, БАК защищает от расщепления нуклеотиды от -87 до -49, а РНК-полимераза - нуклеотиды от

¹ При детальном изучении механизма воздействия *lac*-репрессора с оператором оказалось, что взаимодействию не свойственна такая симметрия, так что пока остается не совсем ясным, почему последовательности *lac*-оператора (и многих других операторов) обладают элементами симметрии. - Прим. перев.

² Далеко не очевидно, почему клетки *E. coli*, как и многие другие клетки, предпочитают именно глюкозу всем остальным источникам углерода и энергии и используют ее до тех пор, пока ее содержание не будет исчерпано даже в присутствии значительного избытка других сахаров. - Прим. перев.

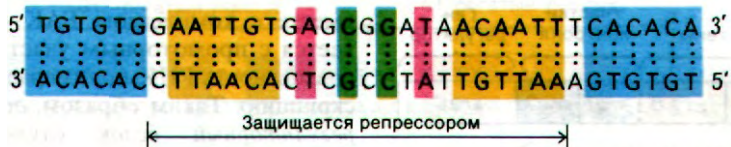


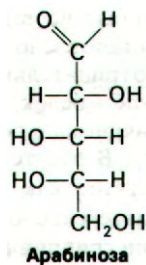
Рис. 28.7. Нуклеотидная последовательность *lac*-оператора. Симметричные участки закрашены одинаковым цветом.

—48 до +5 (рис. 28.8). При этой системе нумерации первый транскрибируемый нуклеотид обозначается +1. Последовательность оснований ДНК, узнаваемая БАК, обладает симметрией второго порядка, с которой мы постоянно сталкиваемся при рассмотрении взаимодействий белков с ДНК. Каким образом БАК стимулирует инициацию синтеза лактозной мРНК в 50 раз? Последовательное расположение неперекрывающихся участков связывания БАК и РНК-полимеразы дает основание думать, что связывание БАК с ДНК порождает новые участки взаимодействия РНК-полимеразы с ДНК. Лактозный репрессор, напротив, связывается с нуклеотидами от —3 до +21, которые в значительной степени перекрываются с участком РНК-полимеразы (нуклеотиды от —48 до +5). Таким образом, репрессор препятствует инициации, блокируя связывание РНК-полимеразы. По всей вероятности, комплекс циклический АМР-БАК действует таким же образом и на другие индуцибельные опероны. Итак, индуцибельные опероны контролируются с помощью комплементарных механизмов, которые используют в качестве сигнальных молекул циклический АМР и специфические индукторы.

28.7. Различные формы одного и того же белка активируют и ингибируют транскрипцию арабинозного оперона

Бактерии могут использовать арабинозу в качестве источника энергии, превращая ее в ксилулозо-5-фосфат - промежуточный продукт пентозофосфатного пути (разд. 15.4). Превращение арабинозы в ксилулозо-5-фосфат происходит в результате последовательного действия арабинозо-изомеразы, рибулокиназы и рибулозо-5-фосфат-эпимеразы - ферментов, кодируемых генами *araA*, *araB* и *araD* соответственно. Эти структурные гены вместе

с промотором (*araI*) и оператором (*araO*) образуют арабинозный оперон (рис. 28.9). Этот оперон регулируется геном (*araC*), расположенным рядом с операторным участ-



ком. Подобно лактозному оперону, арабинозный оперон может быть активирован комплексом БАК с циклическим АМР. Ара-

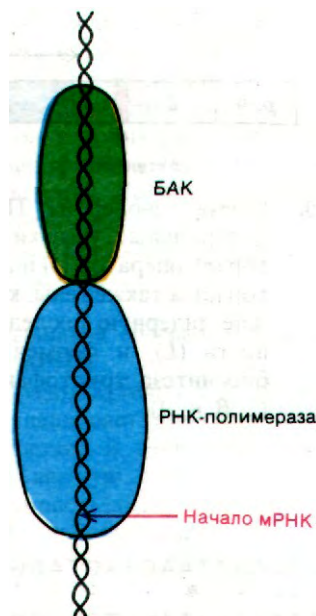


Рис. 28.8. На схеме показаны БАК и РНК-полимераза, сидящие на ДНК-матрице. Положение этих белков было определено с помощью расщепления нуклеазой.

28. Регуляция выражения гена в фенотипе



Рис. 28.9. Карта арабинозного оперона и его регуляторного гена.

бинозный оперон был первым, в отношении которого было установлено наличие и положительной, и отрицательной регуляций. Продукт гена *araC* - белок, который существует в двух функционально различных состояниях P_1 и P_2 . В отсутствие арабинозы этот белок действует как репрессор (P_1). Форма P_1 связывается с оператором, что препятствует транскрипции оперона. Арабиноза снимает P_1 с оператора и смещает конформационное равновесие в сторону P_2 (активирующей формы). Затем форма P_2

вместе с комплексом БАК-сАМР связывается с промоторным участком, что дает возможность РНК-полимеразе начать транскрипцию. Таким образом, один и тот же регуляторный белок служит положительным и отрицательным регулятором.

28.8. Транскрипция триптофанового оперона регулируется и аттенуатором, и оператором

Еще один регуляторный элемент был открыт Чарльзом Янофски (Charles Yanofsky) и его коллегами при изучении триптофанового оперона *E. coli*. Транскрибируемая с этого оперона мРНК длиной 7kb кодирует пять ферментов, превращающих хоризмат в триптофан (разд. 21.9). Эти пять белков синтезируются при трансляции полицистронной *trp*-мРНК последовательно, координированно и в эквимольных количествах. Трансляция начинается раньше, чем заканчивается транскрипция. *trp*-мРНК синтезируется примерно за 4 мин и затем быстро разрушается. Короткое время жизни

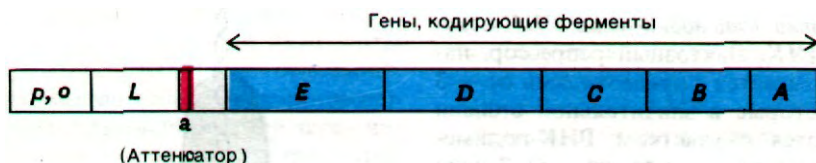


Рис. 28.10. Схема *trp*-оперона. Показаны контрольные участки - промотор (p), оператор (o) и аттенуатор (a), а также гены, кодирующие лидерную последовательность (L), и ферменты пути биосинтеза триптофана (E , D , C , B и A).

trp-мРНК, составляющее всего около 3 мин, позволяет бактериям быстро реагировать на изменяющуюся потребность в триптофане. *E. coli* может менять скорость образования ферментов биосинтеза триптофана более чем в 700 раз.

Как осуществляется эта регуляция? Первый уровень регуляции достигается путем взаимодействия специфического репрессора с *trp*-операторным участком ДНК. *trp*-репрессор - белок с массой 58 кДа, кодируемый геном *trpR*, удаленным от *trp*-оперона на довольно большое расстояние. Комплекс этого репрессора и триптофана прочно связывается с оператором, тогда как сам по себе репрессор с ним не связывается. Другими словами, триптофан является корепрессором. Мишень, на которую действует комплекс триптофана с репрессором, - участок ДНК, обладающий симметрией второго порядка (рис. 28.11); и в этом случае симметрия играет важную роль во взаимодействии белка с ДНК. Этот операторный участок перекрывается с промоторным участком иницирования транскрипции. Та-



Рис. 28.11. Последовательность оснований *trp*-оператора. Ось симметрии второго порядка обозначена зеленым. Пара оснований, отмеченная +1, - начало транскрибируемой части оперона.

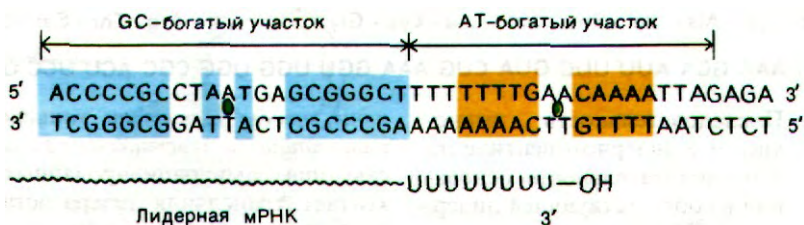


Рис. 28.12. Последовательность основной аттенюаторной области *trp*. Связанные симметрией второго порядка пары оснований GC-богатой области показаны синим цветом; такие же пары AT-богатой области показаны желтым цветом.

ким образом, связывание *trp*-репрессора с оператором препятствует связыванию РНК-полимеразы с *trp*-промотором, и гены *trp* не транскрибируются.

В течение некоторого времени считалось, что ингибирование конечным продуктом каталитической активности первого ферментативного комплекса в пути биосинтеза триптофана (разд. 21.11) и система ингибирования транскрипции с участием репрессора и оператора - основные регуляторные системы биосинтеза триптофана. Эта точка зрения была неожиданно опровергнута, когда было обнаружено, что у некоторых мутантов с делециями между оператором и геном первого фермента (*trpE*) в опероне происходит повышенное образование *trp*-мРНК. К тому же анализ 5'-концевой последовательности *trp*-мРНК показал, что там имеется лидерная последовательность длиной 162 нуклеотида, расположенная перед иницирующим кодоном *trpE*. Затем оказалось, что делеции, повышающие содержание *trp*-мРНК, картируются в этой лидерной области, примерно в 30-60 нуклеотидах от начала гена *trpE*. Следующее поразительное наблюдение состояло в том, что при высокой концентрации триптофана образовывался транскрипт, содержащий всего 130 нуклеотидов лидерной последовательности; при нехватке же триптофана синтезировалась *trp*-мРНК длиной 7000 нуклеотидов, включающая полную лидерную последовательность. Отсюда Янофски сделал вывод, что транскрипция *trp*-оперона должна регулироваться участком контролируемой терминции, называемым аттенюатором. Он локализован между оператором

и геном первого фермента пути биосинтеза триптофана. Этот участок терминции, регулируемый физиологическими условиями, подобен участкам терминции в конце других оперонов (разд. 25.15); он содержит GC-богатую последовательность и следом за ней AT-богатый участок. Каждый из этих участков аттенюатора обладает симметрией второго порядка (рис. 28.12). Кроме того, терминированный лидерный транскрипт заканчивается несколькими U подряд.

Аттенюаторный участок дополняет оператор в регуляции транскрипции *trp*-генов. При избытке триптофана инициация транскрипции блокируется в результате связывания комплекса триптофан-репрессор с оператором. По мере снижения концентрации триптофана в клетке репрессия снижается и начинается транскрипция. Однако некоторые молекулы РНК-полимеразы покидают матрицу, дойдя до аттенюатора, тогда как другие продолжают синтезировать полную *trp*-матрицу. По мере истощения триптофана увеличивается доля молекул РНК-полимеразы, проходящих через аттенюаторный участок.

28.9. Аттенюация опосредуется трансляцией лидерной мРНК

Каким образом аттенюаторный участок *trp*-оперона улавливает концентрацию триптофана в клетке? В решении этого вопроса особенно важную роль сыграли данные о том, что часть лидерной мРНК транслируется. Весьма существенно, что в 14-членном лидерном полипептиде (рис. 28.13) имеются остатки триптофана в положениях 10 и 11. Когда триптофан находится в избытке, синтезируется полный лидерный пептид. Но если триптофана не хватает, рибосома задерживается на двух расположенных тандемом кодонах UGG, поскольку в этом случае оказывается недостаточным содержание триптофанил-тРНК. Застыв-

28. Регуляция выражения гена в фенотипе

Рис. 28.13. Последовательность аминокислот в лидерном пептиде *trp* и последовательность оснований в соответствующей лидерной мРНК.

шая рибосома каким-то образом меняет структуру мРНК, так что РНК-полимераза транскрибирует оперон за пределами аттенуаторного участка. Ключевой аспект этого регуляторного механизма состоит в том, что трансляция и транскрипция тесно сопряжены между собой. Рибосомы, транслирующие лидерную *trp*-мРНК, следуют непосредственно за молекулой РНК-полимеразы, транскрибирующей ДНК-матрицу. Исследования, проведенные в последние годы, показали, что застрявшая рибосома изменяет вторичную структуру мРНК: конформация, при которой основания спариваются, благоприятствуя тем самым терминированию транскрипции, изменяется таким образом, что РНК-полимераза проскакивает аттенуатор (рис. 28.14). Мы начинаем понимать, что молекулы нуклеиновых кислот, как и белковые молекулы, могут принимать различные конформации и что изменения конформации регулируются и имеют далеко идущие физиологические последствия.

28.10. Аттенуаторный участок гистидинового оперона содержит семь гистидиновых кодонов подряд

В настоящее время известны еще два оперона биосинтеза аминокислот у *E. coli*, содержащих аттенуаторные участки. Фенилаланиновый оперон и гистидиновый оперон, подобно триптофановому оперону, содержат регулируемые участки терминирования перед первым геном, кодирующим фермент. И в этих случаях лидерная область перед участком терминирования транслируется. Удивительна последовательность аминокислот в лидерном пептиде фенилаланинового оперона: 7 из 15 остатков - фенилаланины (рис. 28.15). Еще поразительнее лидерный пептид гистидинового оперона: он содержит семь остатков гистидина подряд. Очевидно, что эти лидерные мРНК предназна-

чены, чтобы улавливать концентрации фенилаланина и гистидина. Если соответствующих аминокислотированных тРНК не хватает, трансляция лидера останавливается. Как уже обсуждалось выше на примере *trp*-оперона, считается, что застрявшая рибосома таким образом изменяет конформацию мРНК, что у нее происходит спаривание оснований. Это дает возможность РНК-полимеразе проскакивать аттенуаторный участок¹. Присутствие семи последовательно расположенных кодонов гистидина в лидерной мРНК гистидинового оперона существенно увеличивает чувствительность этого детектора. Действительно, падение концентрации гистидил-тРНК на 15% вызывает трехкратное увеличение числа молекул мРНК, транскрибируемых с этого оперона.

28.11. Репрессоры и активаторы

детерминируют развитие умеренных фагов

Обратимся теперь к роли репрессоров и активаторов транскрипции в регуляции жизненного цикла *бактериофага лямбда* (λ). Зрелая вирусная частица состоит из линейной двухспиральной молекулы ДНК (48 kb), упакованной в белковую оболочку. Существует два пути развития вируса: он может разрушить клетку-хозяина или он может стать ее компонентом (отсюда и название - *умеренный*). При *литическом* пути развития происходит полное выражение (экспрессия) фаговых генов, что приводит к лизису бактерии и образованию примерно 100 вирусных частиц потомства. В другом случае развитие фага λ может пойти по пути *лизогенизации клетки*, когда его ДНК становится ковалентно связанной с ДНК клетки-хозяина в строго определенном месте (сайт-специфическая интеграция). Этот процесс рекомбинации, в котором участвует кольцевая молекула ДНК фага λ , мы обсудим ниже (разд. 30.16). Когда ДНК фага интегрирует с ДНК клетки-хозяина, большинство фаговых функций выключается. Фаговая ДНК в таком состоянии называется *профагом*, а клетка-хозяин, содержащая профаг - *лизогенной бактерией*. Профаг реплицируется

¹ Автор противоречит собственному утверждению, что застрявшая рибосома разворачивает мРНК (см. предыдущий разд.); рибосома действительно способствует именно разворачиванию мРНК. - *Прим. перев.*

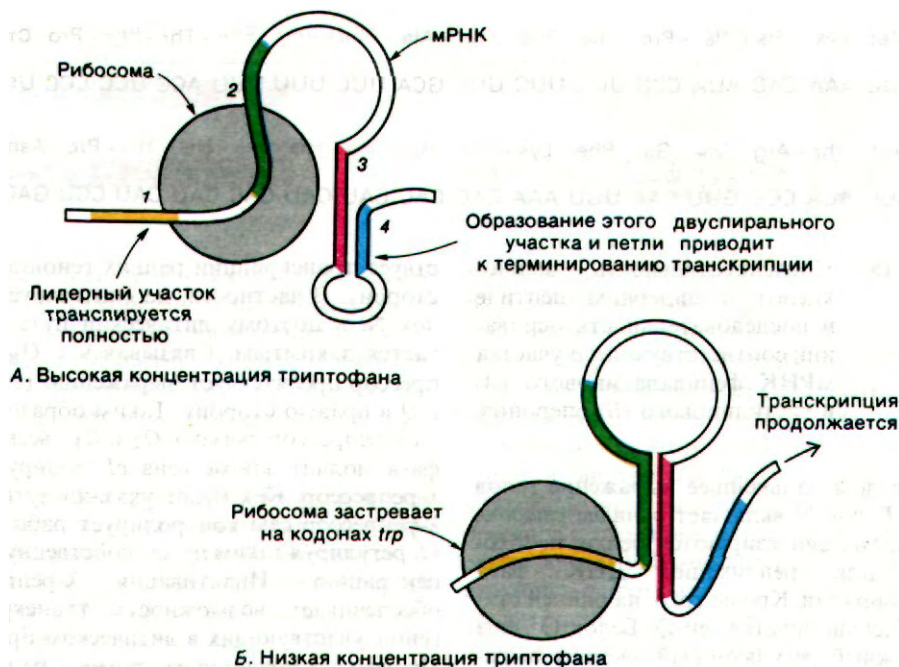


Рис. 28.14. Схематическое изображение аттенуации *trp*-оперона *E. coli*. Когда триптофан имеется в избытке (А), лидерный участок (обозначен цифрой 1) *trp*-мРНК полностью транслируется. Участок 2 взаимодействует с рибосомой, что позволяет основаниям участков 5 и 4 спариваться. Эта спаренная область каким-то образом сигнализирует РНК-полимеразе о том, что следует закончить транскрипцию. Если же триптофана не хватает (Б), участки 3 и 4 не взаимодействуют, так как рибосома застревает на *trp*-кодонах участка 1. Участок 2 взаимодействует с участком 3 вместо того, чтобы входить в рибосому, и в результате участки 3 и 4 не могут спариваться. Вследствие этого транскрипция продолжается. [Oxender D. L., Zurawski G., Yanofsky C., Proc. Nat. Acad. Sci., 76, 5524 (1979).]

ские функции молчат, но не теряются (рис. 28.17). Многие агенты, нарушающие нормальную репликацию ДНК в клетке-хозяине, индуцируют профаг, и он переходит на путь литического развития.

Вначале рассмотрим выражение генов фага λ при литическом пути. Цель развития - образование многочисленного потомства - достигается путем *последовательной транскрипции вирусных генов*. Вначале образуются белки, необходимые для репликации и рекомбинации ДНК, затем белки головки и отростка вирусной частицы и белки, необходимые для лизиса клетки-хозяина. Чрезвычайно важное значение имеет строгая очередность этих событий; преждевременное разрушение клетки-хозяина для вируса, конечно, невыгодно. Выражение генов при литическом развитии происходит в три стадии: предраннюю, раннюю и позднюю (рис. 28.18). На *предранней стадии* начинается синтез РНК с двух промоторов - P_L и P_R . Один из образующихся при этом транскриптов служит матрицей для синтеза белка N, которому принадлежит важная регуляторная роль. В отсутствие белка N предранние транскрипты заканчиваются на одном из двух участков терминации. Белок N препятствует завершению транскрипции в этих участках и обеспечивает та-

в лизогенной бактерии как часть клеточной хромосомы обычно на протяжении многих поколений. В лизогенном состоянии литиче-

28. Регуляция выражения гена в фенотипе

А Met - Lys - His - Ile - Pro - Phe - Phe - Phe - Ala - Phe - Phe - Phe - Thr - Phe - Pro - Стоп
 5' AUG AAA CAC AUA CCG UUU UUC UUC GCA UUC UUU UUU ACC UCC CCC UGA 3'

Б Met - Thr - Arg - Val - Gln - Phe - Lys - His - His - His - His - His - His - His - Pro - Asp -
 5' AUG ACA CGC GUU CAA UUU AAA CAC CAC CAU CAU CAC CAU CAU CCU GAC 3'

Рис. 28.15. Последовательность аминокислот в лидерном пептиде и последовательность оснований соответствующего участка мРНК фенилаланинового (А) и гистидинового (Б) оперонов.

ким образом дальнейшее выражение генов фага λ . Белок N включает *раннюю стадию*. В это время синтезируются белки, необходимые для репликации ДНК фага и рекомбинации. Кроме того, на ранней стадии транскрибируется ген Q. Белок Q - еще один важный регуляторный элемент выражения генов фага λ . Он необходим для перехода в *позднюю стадию*. На поздней стадии транскрибируются гены, необходимые для образования головки и отростка фага и для лизиса клетки-хозяина. Белок Q, подобно белку N, подавляет терминацию транскрипции. *Короче говоря, последовательная регуляция литического развития осуществляется двумя белками - положительными регуляторами, кодируемыми генами N и Q. Их действие заключается в том, что они позволяют РНК-полимеразе продолжать транскрипцию, проскочив несколько участков терминации.*

В лизогенном цикле различают три стадии: *установление лизогенного состояния, его поддержание и выход из лизогенного состояния*. Для установления состояния профага необходимо, чтобы вирусная ДНК интегрировалась с ДНК клетки-хозяина и литические функции вируса были инактивированы. Эти процессы протекают очень сложно, и до конца они не изучены. Поддержание состояния профага, наоборот, сравнительно несложный процесс. А. Дейл Кейзер (A. Dale Kaiser) показал, что из всех генов профага *экспрессируется только ген cI*. Этот ген кодирует λ -репрессор, который связывается с двумя операторными участками O_L и O_R (рис. 28.19). Связывание λ -репрессора с O_L непосредственно препят-

ствует транскрипции ранних генов в левую сторону. В частности, не синтезируется белок N, и поэтому литический путь оказывается закрытым. Связываясь с O_R , λ -репрессор препятствует выражению генов *cro* и *Q* в правую сторону. Таким образом, когда λ -репрессор связан с O_L и O_R , весь геном фага молчит, кроме гена *cI*, кодирующего λ -репрессор. Как будет указано чуть ниже, λ -репрессор сам контролирует работу гена *cI*, регулируя таким путем собственную концентрацию. Инактивация λ -репрессора обеспечивает возможность транскрипции генов, участвующих в литическом процессе. Профаг исключается из хромосомы клетки-хозяина, и литические функции экспрессируются.

28.12. Два оператора фага лямбда содержат ряд участков связывания репрессора
 λ -Репрессор был выделен и подробно изучен Марком Пташне (Mark Ptashne). Моно-

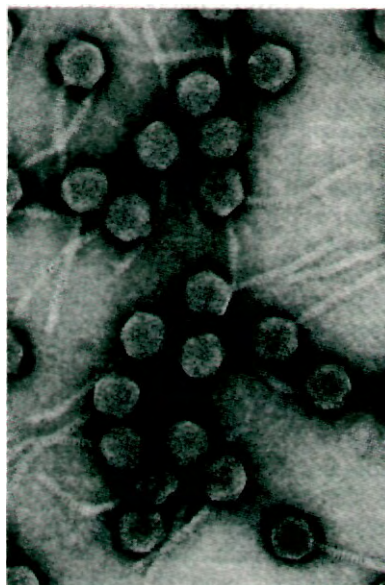


Рис. 28.16. Электронная микрофотография фагов λ . (Печатается с любезного разрешения д-ра A. Dale Kaiser.)

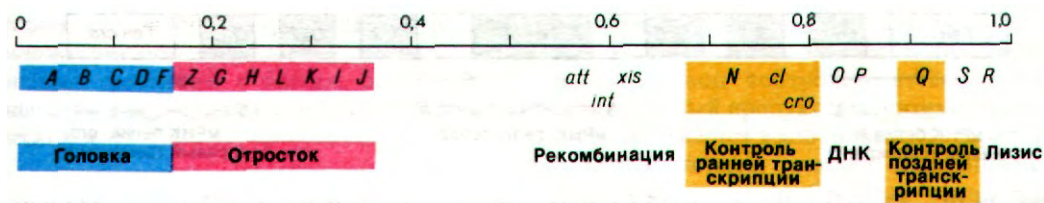


Рис. 28.17. Генетическая карта фага λ . Показаны лишь некоторые гены. После проникновения в бактериальную клетку линейная двухцепочечная ДНК переходит в кольцевую форму.

мере массой 26 кДа находится в равновесии с олигомерами. С ДНК связываются именно олигомеры. Два операторных участка - O_L и O_R - узнаются одним и тем же репрессором. Ген *cI*, кодирующий этот репрессор, расположен между O_L и O_R (рис. 28.19). Каждый из этих операторов содержит три участка связывания λ -репрессора. Расщепление с помощью нуклеаз показало, что участки связывания представляют собой последовательность из 17 пар оснований и отделены друг от друга АТ-богатыми участками длиной от 3 до 7 пар оснований. Последовательности оснований всех этих участков связывания λ -репрессора сходны, но не идентичны. Узнаваемая последовательность - 5'-ТАТСАСССГС-3' или что-нибудь в этом роде. Как и *lac*-оператор, эти

операторные участки обладают частичной симметрией второго порядка.

Самые сильные места связывания репрессора в операторах O_L и O_R расположены ближе всего к началу первого структурного гена оперона. Промоторный участок гена *N* расположен в пределах O_L а промотор гена *cro* - внутри O_R . Как и в лактозном, и в арабинозном оперонах, связывание репрессора с этими операторами препятствует связыванию РНК-полимеразы с соответствующим промотором, и, следовательно, транскрипция не начинается. Связывание λ -репрессора с двумя участками в O_L и O_R более эффективно блокирует промотор, чем связывание только с одним участком.

28.13. λ -Репрессор регулирует собственный синтез

Число молекул λ -репрессора в лизогенных клетках *E. coli* строго регулируется. Снижение количества репрессора (даже кратковременное) переводит клетку на литический путь. С другой стороны, избыток репрессора затруднит выход фага, если условия его существования в бактерии станут неблаго-

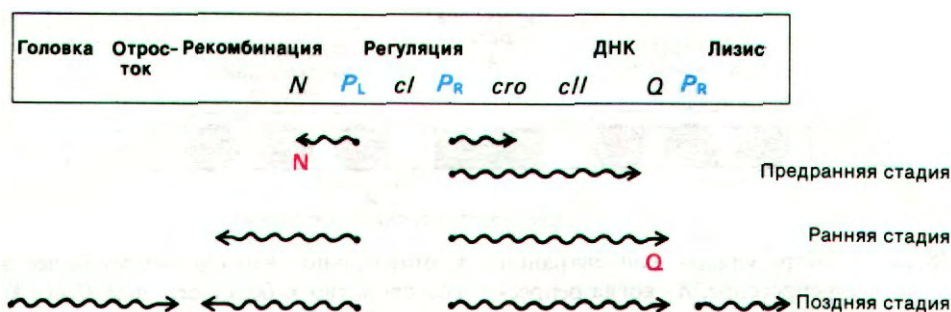


Рис. 28.18. Три стадии транскрипции при литическом цикле развития фага λ . Белок N образуется на предранней стадии и активирует раннюю стадию. Тогда в свою очередь синтезируется белок Q, который активирует позднюю стадию. [Echols H., The Bacteria, 8, 502 (1979).]

приятными. Как регулируется концентрация λ -репрессора? Проведенные сравнительно недавно исследования показали, что это репрессор регулирует собственный синтез. Для этого λ -репрессор связывается с O_R операторным участком, локализованным

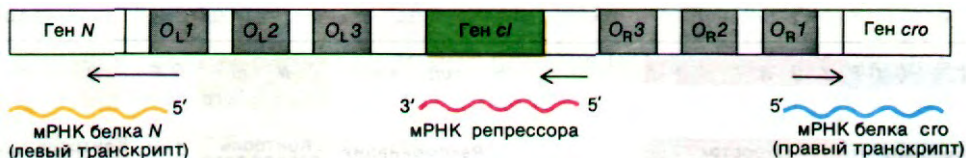


Рис. 28.19. Схематическое изображение операторных участков O_L и O_R и прилегающих генов. Самое высокое сродство к λ -репрессору имеют O_L1 и O_R1 . cI - ген-репрессор. Левый транскрипт начинается с гена N , правый - с гена cro .

ближе всего к гену cI , и выключает транскрипцию этого гена (рис. 28.20). Связывание репрессора с O_R1 , напротив, усиливает транскрипцию гена cI . Напомним, что сродство λ -репрессора к O_R1 выше, чем к O_R3 . Таким образом, транскрипция гена cI усиливается

при низкой концентрации λ -репрессора и подавляется при высокой концентрации того же белка. Другими словами, выражение гена cI - саморегулирующаяся система.

Описанная регуляция по принципу обратной связи стремится поддерживать концентрацию репрессора на таком уровне, чтобы остальной геном фага не экспрессировался. Как же тогда фаг может выйти из состояния лизогении? Литический цикл запускается при снижении числа молекул λ -репрессора; содержание λ -репрессора должно уменьшаться до такого уровня, которого достаточно только для транскрипции гена cro . Новообразованный белок cro связывается с O_R3 и подавляет транскрипцию гена cI .

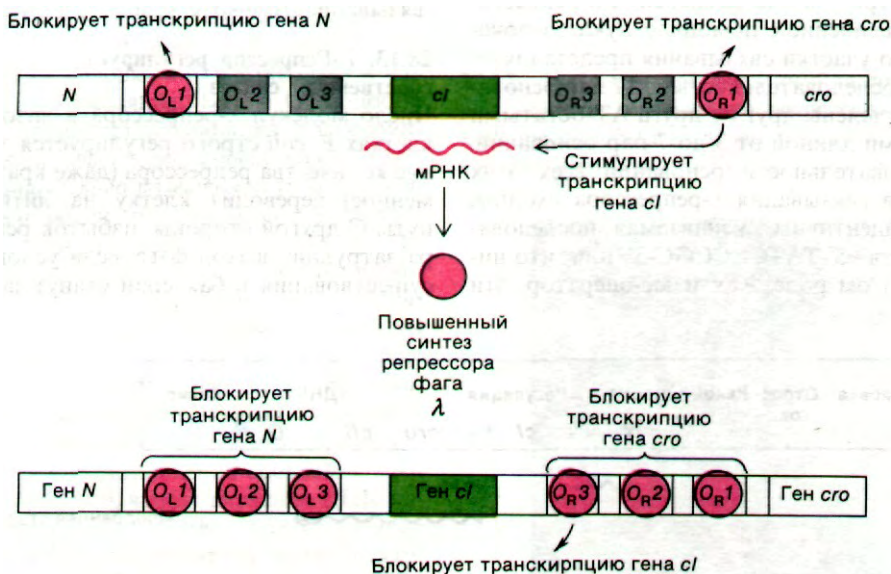


Рис. 28.20. Саморегуляция концентрации λ -репрессора. А - когда репрессора мало, он связывается с O_R1 и стимулирует транскрипцию гена cI . Б - по мере увеличения концентрации λ -репрессора он связывается с O_R3 и ингибирует дальнейшую транскрипцию гена cI .

Самое главное, что O_R3 имеет более высокое сродство к белку cro , чем O_R1 . Таким образом, небольшое количество белка cro подавляет синтез λ -репрессора, не выключая синтеза самого белка cro . Вследствие этого λ -репрессор уже не может руководить ходом событий. С этого момента необратимо запускается цепь реакций, ведущих к лизису. Таким образом, тонкое взаимодействие всего нескольких белков и операторных участков определяет путь развития фага. Было бы интересно выяснить, имеют ли неко-

торые регуляторные системы, такие, как множественные операторные участки с различным сродством к белкам, более общее значение в регуляции развития прокариотических клеток.

Закключение

Клетки регулируют количество синтезируемых белков различными способами. У *E. coli* выражение генов регулируется в первую очередь на уровне транскрипции, а не трансляции. Многие гены организованы в опероны - координированные единицы генетической экспрессии. Оперон состоит из регуляторных участков (оператора и промотора) и нескольких структурных генов. Вне оперона имеется регуляторный ген, кодирующий белок, который взаимодействует с операторным участком. Последовательность оснований лактозного оператора симметрична. Вообще симметрия играет основную роль в узнавании определенных участков в ДНК белками. *lac*-Оперон индуцируется β -галактозидами, например аллолактозой и изопропилтиогаалактозидом. Связывание индуктора с *lac*-репрессором приводит к его вытеснению с оператора. Теперь РНК-полимераза может пройти через оператор и транскрибировать *lac*-оперон. Триптофановый оперон репрессируется триптофаном, который связывается со специфическим репрессором и дает ему таким образом возможность связаться с оператором. В результате транскрипция генов, кодирующих ферменты биосинтеза триптофана, выключается.

Кроме того, некоторые опероны биосинтеза аминокислот, в том числе *trp*-оперон, находятся под контролем аттенуаторов. Если конечный продукт биосинтеза - аминокислота - имеется в избытке, транскрипция в аттенуаторном участке прекращается. Для аттенуации необходима трансляция лидерной мРНК. Регуляция широкого спектра генов осуществляется циклическим АМР, который связывается с особым белком (БАК). Этот комплекс взаимодействует с промоторными участками нескольких индуцибельных оперонов и стимулирует иницирование транскрипции. Концентрация циклического АМР повышается только при недостатке глюкозы. Таким образом, глюкоза косвенно подавляет синтез различных ферментов катаболизма.

Бактериофаг λ может размножаться и разрушать клетки-хозяева (литический путь); в другом случае его ДНК может интегрироваться с хромосомой клетки-хозяина (лизогенный путь). При литическом развитии происходит последовательная транскрипция трех групп генов. На предранней стадии образуется белок N, активирующий транскрипцию ранних генов. При этом в свою очередь синтезируется белок Q - активатор поздней стадии транскрипции. Лизогенное состояние поддерживается λ -репрессором, который кодируется геном *cI*. Репрессор связывается с операторами O_R и O_L и препятствует транскрипции предранних генов. Присутствие многочисленных участков связывания в этих операторах позволяет λ -репрессорам регулировать собственный синтез.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Jacob F., Monod J., 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins, J. Mol. Biol., 3, 318-356. (В этой блистательной статье была предложена модель оперона и сформулировано представление об информационной РНК.)
Ptashne M., Gilbert W., 1970. Genetic repressors, Sci. Amer., 222(6), 36-44.
Maniatis T., Ptashne M., 1976. A DNA operator-repressor system, Sci. Amer., 234(1), 64-76.

Лактозный оперон

Miller J.H., Reznikoff W.S., 1978. The Operon, Cold Spring Harbor Laboratory. (Превосходный сборник статей, касающихся регуляторных механизмов *E. coli* и фага λ . Детально рассмотрены лактозный, триптофановый, арабинозный, гистидиновый и галактозный опероны.)
Gilbert W., Muller-Hill B., 1966. Isolation of the *lac* repressor, Proc. Nat. Acad. Sci., 56, 1891-1898.
Dickson R., Abelson J., Barnes W.,

Reznikoff W., 1975. Genetic regulation: the *lac* control region, Science, 187, 27-35.

Арабинозный оперон

Wilcox G., Meuris P., Bass P., Englesberg E., 1974. Regulation of the arabinose operon in vitro, J. Biol. Chem., 249, 2946-2952.
Hirsh J., Schleif R., 1976. Electron microscopy of gene regulation: the L-arabinose operon, Proc. Nat. Acad. Sci., 73, 1518-1522.

- Триптофановый и гистидиновый опероны**
 Platt T., 1978. Regulation of gene expression in the tryptophan operon of *Escherichia coli*. In: Miller J. H. and Reznikoff W. S. (eds.), The Operon, pp. 213-302, Cold Spring Harbor Laboratory. (Четко изложены представления о *trp*-опероне.)
 Oxender D.L., Zurawski G., Yanofsky C., 1979. Attenuation in the *Escherichia coli* tryptophan operon: the role of RNA secondary structure involving the Trp codon region, Proc. Nat. Acad. Sci., **76**, 5524-5528.
 Bertrand K., Korn L., Lee F., Platt T., Squires C.L., Squires C., Yanofsky C., 1975. New features of the regulation of the tryptophan operon, Science, **189**, 22-26. (Рассказ об истории открытия аттенуации транскрипции.)
 Barnes W.M., 1978. DNA sequence from the histidine operon control region: seven histidine codons in a row, Proc. Nat. Acad. Sci., **75**, 4281-4285.
 Stephens J. C., Artz S. W., Ames B. N., 1975. Guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp): positive effector for histidine operon transcription and general signal for amino acid deficiency, Proc. Nat. Acad. Sci., **72**, 4389-4393.
Циклический AMP и катаболитная репрессия
 Pastan L., Adhya S., 1976. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in *Escherichia coli*, Bacteriol. Rev., **40**, 527-551.
 Zubay G., Schwartz D., Beckwaith J., 1970. Mechanism of activation of catabolite-sensitive genes: a positive control system, Proc. Nat. Acad. Sci., **66**, 104-110.
Регуляция транскрипции фага λ
 Ptashne M., Backman K., Humayun M.Z., Jeffrey A., Maurer R., Meyer B., Sauer R. T., 1976. Autoregulation and function of a repressor in bacteriophage lambda, Science, **194**, 156-161.
 Johnson A., Meyer B.J., Ptashne M., 1978. Mechanism of action of the *cro* protein of bacteriophage λ , Proc. Nat. Acad. Sci., **75**, 1783-1787.
 Ptashne M., Jeffrey A., Johnson A.D., Maurer R., Meyer B.J., Pabo C.O., Roberts T.M., Sauer R.T., 1980. How the λ repressor and *cro* work, Cell, **19**, 1-11.
 Hershey A.D. (ed.), 1971. The Bacteriophage Lambda, Cold Spring Harbor Laboratory. [Имеется перевод: Фаг лямбда.- М.: Мир, 1975.] (Содержит множество сведений о фаге λ .)
 Reichardt L., Kaiser A.D., 1971. Control of λ repressor synthesis, Proc. Nat. Acad. Sci., **68**, 2185-2189.

Вопросы и задачи

- К какому результату приведут следующие мутации?
 - Делеция регуляторного гена *lac*-оперона.
 - Делеция регуляторного гена *trp*-оперона.
 - Делеция регуляторного гена *ara*-оперона.
 - Делеция гена *cI* фага λ .
 - Делеция гена *N* фага λ .
- Суперрепрессированные мутанты по *lac*-оперону (i^s) ведут себя как неиндуцибельные мутанты. Ген i^s доминирует над геном i^+ в частичных диплоидах. Каким может быть молекулярный механизм этой мутации?
- Имеется мутант *E. coli*, синтезирующий большие количества β -галактозидазы независимо от того, присутствует ли в среде индуктор. Частичные диплоиды, образованные из этого мутанта и $Fi^+ o^+ z^-$, также синтезируют много β -галактозидазы независимо от присутствия индуктора. Какая мутация могла бы привести к такому результату?
- Из культуры дикого типа выделен мутант, неспособный расти на галактозе, лактозе, арабинозе и ряде

- других источников углерода. Концентрация циклического AMP в клетках мутанта нормальна. Какая мутация могла бы привести к такому результату?
- Клетка *E. coli*, несущая профаг λ , иммунна к литическому инфицированию этим фагом. Почему?
 - Транскрипция *cI* может быть иницирована с промотора p_{RE} , предназначенного для установления лизогении, или p_{RM} , предназначенного для ее поддержания. Транскрипты с p_{RM} начинаются с 5'-концевого кодона AUG λ -репрессора, а в транскрипте p_{RE} этому кодо-ну инициации предшествует последовательность, комплементарная 3'-концевой последовательности 16S-rРНК. Для инициации на участке p_{RE} необходимы белки, кодируемые фагом, которые не экспрессируются в лизогенном состоянии.
 - Какой транскрипт будет транслироваться с большей эффективностью?
 - Каково возможное физиологическое значение этого различия?

Дополнительные вопросы см.: Hood L.E., Wilson J. H., Wood W. B., Molecular Biology of Eucaryotic Cells, Benjamin, 1975, ch. 1.

ГЛАВА 29

Эукариотические хромосомы и выражение генов у эукариот

Эукариотическая клетка содержит гораздо больше генетической информации, чем прокариотическая. Например, в клетке человека в 1000 раз больше ДНК, чем в клетке *E. coli*, и примерно в 100000 раз больше, чем в одном вирионе фага λ . Это изобилие ДНК наделяет эукариот большими потенциальными возможностями, которых нет у прокариот. Другое отличие состоит в том, что ДНК высших организмов ассоциирована с основными белками - *гистонами*, а хромосомы низших организмов таких белков не содержат. Предназначение этих основных белков - упаковывать ДНК, с тем чтобы при контурной длине, равной многим сантиметрам, она могла бы поместиться в объеме диаметром несколько микрометров. Характерная морфология эукариотических хромосом, которую легко наблюдать в световом микроскопе, показывает, что они организованы значительно сложнее, чем геномы прокариотических клеток. К тому же форма эукариотических хромосом резко меняется в ходе клеточного цикла. Еще одна важная особенность, которая собственно и отличает эукариот от прокариот, состоит в том, что эукариотические хромосомы окружены *ядерной мембраной*. Этой мембраны у прокариот нет, равно как нет и других внутренних мембран. Благодаря наличию мембраны *транскрипция и трансляция у эукариот разделены во времени и в пространстве*, тогда как у прокариот они тесно сопряжены. В ядрах высших организмов первичные транскрипты подвергаются значительной модификации, расщепляются и их фрагменты соединяются. Лишь небольшая часть синтезированных в ядре РНК выходит в цитозоль в виде мРНК. Очевидно,

что у эукариот выражение (экспрессия) генов осуществляется значительно более сложным путем, чем у прокариот. Исследования в этой области быстро развиваются, поскольку мы научились выделять и клонировать гены эукариот, определять в них последовательность нуклеотидов и осуществлять их выражение в хорошо изученных системах. По всему чувствуется, что мы находимся на пороге раскрытия одной из важнейших проблем биологии — механизма клеточной дифференцировки.

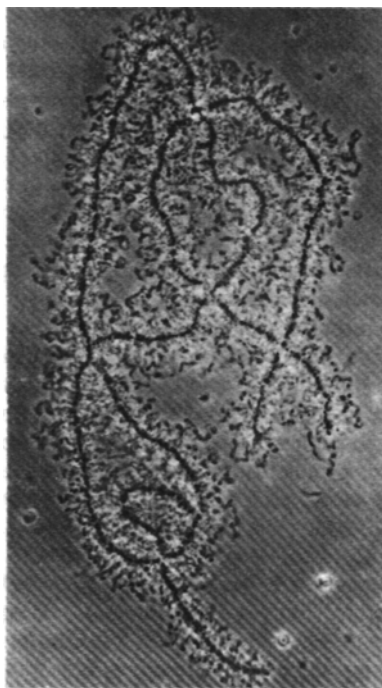


Рис. 29.1. Фазово-контрастная микрофотография хромосомы типа ламповой щетки из ооцита. (Печатается с любезного разрешения д-ра Joseph Gall.)

**29. Хромосомы и выражение
генов у эукариот**



Рис. 29.2. Радиоавтограф молекулы ДНК *Drosophila melanogaster*. Контурная длина этой ДНК равна 1,2 см. [Kavenoff R., Klotz L. C., Zimm B. H., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 38, 4 (1974).]

29.1. Эукариотическая хромосома содержит одну молекулу двухспиральной ДНК

Можно ли утверждать, что хромосома содержит одну длинную молекулу ДНК? В течение многих лет на этот вопрос было трудно ответить, так как очень длинные молекулы ДНК невероятно чувствительны к разрыву под действием сил сдвига. Бруно Зимм (Bruno Zimm) решил эту проблему с помощью метода *вязкостной эластомерии*, позволяющего измерять длину *самых крупных молекул ДНК в смеси*. Молекулы ДНК растягивают в потоке жидкости, и затем им дают свернуться в нормальное состояние. Время, за которое свертывается половина молекул, зависит от их молекулярной массы. Клетки плодовых мушек лизировали в камере для измерений, чтобы избежать разрывов ДНК при переносе образцов. Нуклеазы инактивировали, инкубируя образцы в присутствии детергента при 65°C. Кроме того, для гидролиза связанных с ДНК белков добавляли проназу.

Масса самых крупных молекул ДНК в полученной смеси составляла $41 \cdot 10^6$ кДа. Эта величина хорошо согласуется с известным содержанием ДНК в самой большой хромосоме *Drosophila melano-*

gaster - $43 \cdot 10^6$ кДа. Превосходное совпадение результатов наблюдалось также в случае мутанта с транслокацией, затрагивающей самую большую хромосому. В этой хромосоме содержится дополнительный кусок ДНК, благодаря которому содержание ДНК в ней достигает $59 \cdot 10^6$ кДа. Измеренное количество ДНК в этой молекуле составило $58 \cdot 10^6$ кДа. Радиоавтографы ДНК *D. melanogaster* (рис. 29.2) подтверждают существование очень длинных молекул ДНК. Эти исследования показали, что *хромосома дрозофилы содержит одну непрерывную молекулу ДНК. Кроме того, эта молекула ДНК линейная и неразветвленная.*

29.2. Эукариотическая ДНК прочно связана с основными белками - гистонами

ДНК эукариотических хромосом находится не в свободном виде, а прочно связана с группой небольших основных белков, называемых *гистонами*. На долю гистонов приходится около половины массы эукариотических хромосом; вторую половину составляет ДНК. Этот нуклеопротеиновый материал хромосомы называется *хроматином*. Если обработать хроматин солью или разбавленной кислотой, гистоны и ДНК можно диссоциировать. Образовавшуюся смесь можно затем разделить с помощью ионообменной хроматографии. Гистоны подразделяются на пять типов, обозначаемых соответственно H1, H2A, H2B, H3 и H4. Они имеют массу от 11 до 21 кДа (табл. 29.1). Удивительная особенность гистонов - *высокое содержание положительно заряженных боковых цепей*: примерно каждый четвертый остаток - лизин или аргинин.

Благодаря *посттрансляционным моди-*

фикациям определенных боковых цепей каждый гистон существует в нескольких формах. Например, лизин-16 гистона H4 может быть ацетилирован. Кроме того, гистоны могут быть метилированы, ADP-рибозилированы и фосфорилированы. Изменения заряда, способности к образованию водородных связей и формы молекул гистонов в результате таких ковалентных модификаций могут играть важную роль в регуляции доступности ДНК для репликации и транскрипции.

29.3. Последовательности аминокислот в гистонах H3 и H4 почти одинаковы у всех животных и растений

Эмиль Смит и Робер Де-Ланж (Emil Smith, Robert DeLange) показали, что последовательности аминокислот в гистоне H4 из проростков гороха и из тимуса теленка различаются только по двум положениям из 102. Замены эти очень незначительны: валин - вместо изолейцина и лизин - вместо аргинина. Таким образом, *последовательность аминокислот гистона H4 сохранилась почти без изменений на протяжении $1,2 \cdot 10^8$ лет, прошедших со времени разделения всего живого на царства растений и животных*. Гистон H3 также мало изменился на протяжении этого колоссального периода эволюции. Последовательности аминокислот в гистоне H3 из проростков гороха и из тимуса теленка различаются по четырем положениям. Интересно сравнить скорость изменения последовательности этих гистонов в ходе эволюции со скоростью изменения других белков. Обычно для этого используется *величина единичного эволюционного периода*. Она равна времени, за которое последовательность аминокислот изменяется на 1% по-

Ser-Gly-Arg-Gly-Lys-Gly-Gly-Lys-Gly-Leu-	10
Gly-Lys-Gly-Gly-Ala-Lys-Arg-His-Arg-Lys-	20
Val-Leu-Arg-Asp-Asn-Ile-Gln-Gly-Ile-Thr-	30
Lys-Pro-Ala-Ile-Arg-Arg-Leu-Ala-Arg-Arg-	40
Gly-Gly-Val-Lys-Arg-Ile-Ser-Gly-Leu-Ile-	50
Tyr-Glu-Glu-Thr-Arg-Gly-Val-Leu-Lys-	60
Phe-Leu-Glu-Asn-Val-Ile-Arg-Asp-Ala-Val-	70
Thr-Tyr-Thr-Glu-His-Ala-Arg-Lys-Thr-	80
Val-Thr-Ala-Met-Asp-Val-Val-Tyr-Ala-Leu-	90
Lys-Arg-Gln-Gly-Arg-Thr-Leu-Tyr-Gly-Phe-	100
Gly-Gly	102

Рис. 29.3. Последовательность аминокислот в гистонах H4 из тимуса теленка. Несколько остатков модифицированы. α-Аминогруппа ацетилирована, равно как и ε-аминогруппа Lys-16. ε-Аминогруппа Lys-20 метилирована или диметилирована. Гистон H4 из проростков гороха имеет такую же последовательность аминокислот, за исключением положений 60 (изолейцин) и 77 (аргинин).

сле того, как дивергируют две эволюционные линии. Эта величина для гистонов H3 и H4 составляет $3 \cdot 10^8$ и $6 \cdot 10^8$ лет соответственно и значительно выше, чем для других исследованных до настоящего времени белков. Например, для цитохрома с единичный эволюционный период составляет $2 \cdot 10^7$ лет, для гемоглобина - $6 \cdot 10^6$ лет, для фибринопептидов - $1 \cdot 10^6$ лет. Замечательная консервативность структуры гистонов H3 и H4 свидетельствует о том, что они выполняют какую-то чрезвычайно важную функцию, возникшую на заре эволюции эукариот и сохранившуюся с тех пор почти без изменений.

Таблица 29.1. Гистоны

Тип	Отношение [Lys]/[Arg]	Число аминокислотных остатков	Масса, кДа	Локализация
H1	20,0	215	21,0	Линкер
H2A	1,25	129	14,5	Сердцевина
H2B	2,5	125	13,8	"
H3	0,72	135	15,3	"
H4	0,79	102	11,3	"

29.4. Нуклеосомы - повторяющиеся субъединицы хроматина

Как происходит взаимодействие гистонов с ДНК и образование нити хроматина? Основываясь на данных, полученных различными методами, Роджер Корнберг (Roger Kornberg) высказал в 1974 г. предположение, что *хроматин состоит из повторяющихся субъединиц, каждая из которых включает 200 пар оснований ДНК*

29. Хромосомы и выражение генов у эукариот

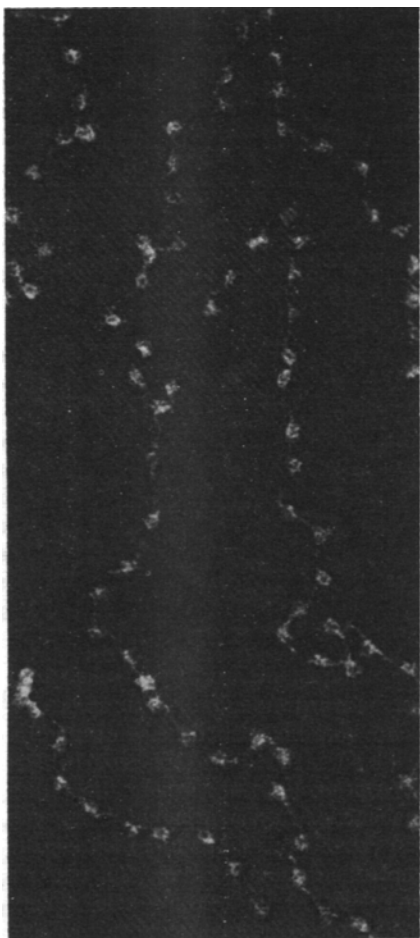


Рис. 29.4. Электронная микрофотография хроматина. Частицы, похожие на бусины, имеют диаметр около 100 Å. (Печатается с любезного разрешения д-ра Ada Olins и д-ра Donald Olins.)

и по 2 молекулы гистонов H2A, H2B, H3 и H4. Теперь эти повторяющиеся единицы называют нуклеосомами. Большая часть ДНК намотана на гистоновую сердцевину (гистоновый кор). Остальная ДНК, так называемый линкер, или межнуклеосомная ДНК, соединяет соседние нуклеосомы и обеспечивает гибкость хроматиновой нити. Таким образом, хроматиновая нить представляет собой гибкую цепочку нуклеосом, напоминающую бусины на нитке.

Целый ряд экспериментальных данных свидетельствует в пользу этой модели структуры хроматина.

1. *Электронная микроскопия.* На электронных микрофотографиях хроматина видны группы расположенных друг за другом бусин диаметром 100 Å, соединенных тонкой нитью (рис. 29.4). Степень растяжения хроматиновой нити зависит от способа подготовки образцов для микроскопии. Некоторые методы дают электронные микрофотографии с более компактным расположением 100-ангстремных бусин. Следовательно, электронная микроскопия прямо подтверждает, что хроматин - цепочка почти сферических частиц, между которыми расположены гибкие участки.

2. *Дифракция рентгеновских лучей и нейтронов.* При рентгеновской дифракции на нитях хроматина также виден повтор длиной 100 Å. Нейтронная дифракция показывает, что ДНК расположена снаружи нуклеосомы.

3. *Нуклеазный гидролиз.* Свободную ДНК в растворе можно расщепить по любой из ее фосфодиэфирных связей с помощью панкреатической дезоксирибонуклеазы I (ДНКазы I) или микрококковой нуклеазы. ДНК в хроматине, за исключением нескольких участков, наоборот, защищена от гидролитического действия нуклеазы. Характер расщепления хроматина поражает своей простотой: на электрофограмме видна лесенка четко выраженных полос (рис. 29.5). В этих фрагментах содержатся фрагменты ДНК, кратные основному повтору длиной примерно 200 пар оснований. Электронные микрофотографии показывают, что число сферических частиц в фрагменте хроматина равно числу 200-парных повторов (рис. 29.6). Например, фрагмент, содержащий ДНК длиной 600 пар оснований, состоит из трех 100-ангстремных частиц. Следовательно, бусина, видимая на электронной микрофотографии, соответствует нуклеосоме, получаемой при нуклеазном гидролизе.

4. *Реконструкция.* Если добавить гистоны к ДНК аденовируса или обезьяньего вируса SV-40, можно получить *in vitro* хроматиноподобную нить. Количество ДНК, связанной с нуклеосомой в таких системах реконструкции, составляет около 200 пар оснований. Кроме того, для образования нуклеосомы необходимо эквивалентное количество гистонов H2A, H2B, H3 и H4. Если

какого-либо гистона в смеси для реконструкции оказывается недостаточно, образования характерных бусин не происходит. Однако гистон Н1 для реконструкции не нужен; этот факт перекликается с тем, что гистон Н1 присутствует не во всех нуклеосомах эукариотических клеток. Исследования дифракции рентгеновских лучей также показывают, что для получения картины, характерной для хроматина, необходимо добавить гистоны Н2А, Н2В, Н3 и Н4.

29.5. Минимальная нуклеосома

(«ядро» нуклеосомы) состоит из ДНК длиной 140 пар оснований, намотанной на октамер гистонов

Содержание ДНК в нуклеосомах различных организмов и типов клеток колеблется от 160 до 240 пар оснований (табл. 29.2). Что лежит в основе этих различий? И в этом случае использование нуклеаз оказалось весьма

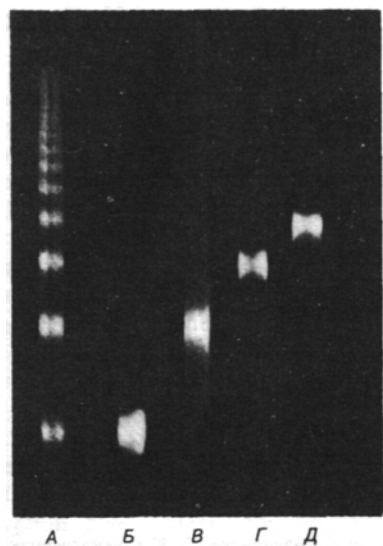


Рис. 29.5. Гель-электрофорез фрагментов ДНК хроматина, полученных с помощью ограниченного гидролиза микрококковой нуклеазой. На дорожку А была нанесена нефракционированная смесь. При центрифугировании в градиенте концентрации сахарозы были получены фракции мономеров (Б), димеров (В), тримеров (Г) и тетрамеров (Д). [Finch J. T., Noll M., Kornberg R. D., Proc. Nat. Acad. Sci., 72, 3321 (1975).]

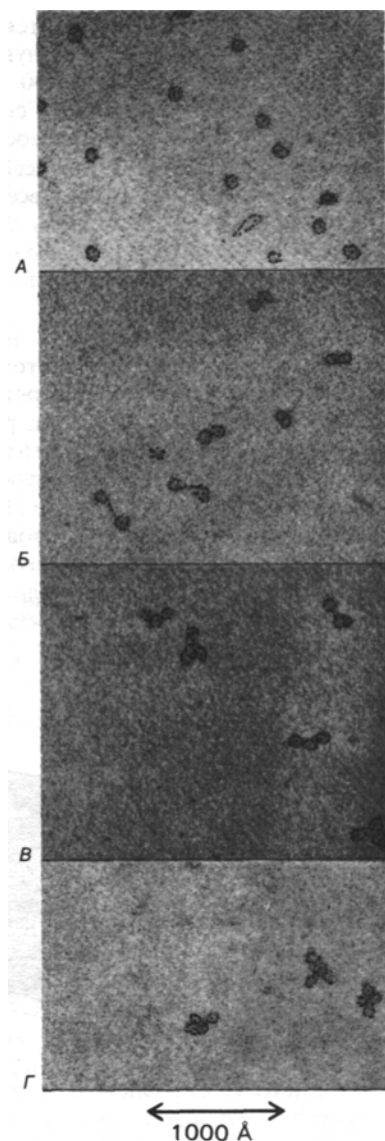


Рис. 29.6. Электронные микрофотографии мономеров (А), димеров (Б), тримеров (В) и тетрамеров (Г) нуклеосом, полученных, как описано в подписи к рис. 29.5. [Finch J. T., Noll M., Kornberg R. D., Proc. Nat. Acad. Sci., 72, 3321 (1975).]

информативным. Нуклеосомы можно в свою очередь гидролизовать микрококковой нуклеазой; при этом получаются *частицы минимальной нуклеосомы* (нуклеосомного «ядра»), содержащие 140 пар оснований, независимо от исходного содержания ДНК в расчете на одну нуклеосому. Эта минимальная нуклеосома, по всей вероятности, практически одинакова у всех эукариот. Она состоит из фрагмента ДНК длиной 140 пар оснований, связанного с октамером гистонов (по два гистона H2A, H2B, H3 и H4).

Минимальные нуклеосомы были получены в кристаллическом виде и в настоящее время исследуются с помощью электронной микроскопии (рис. 29.7) и дифракции рентгеновских лучей. Кристаллизация этих частиц показывает, что нуклеосомы хроматина весьма гомогенны. Арон Круг и Джон Финч (Aaron Klug, John Finch) установили, что минимальная нуклеосома (нуклеосомное «ядро») представляет собой уплощенную частицу размером 110 x 100 x 55 Å и состоит из двух слоев. Фрагмент ДНК

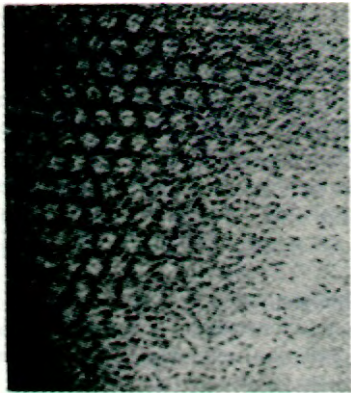


Рис. 29.7. Электронная микрофотография кристалла минимальных нуклеосом. Центры соседних нуклеосом в этом гексагональном слое находятся на расстоянии 100 Å друг от друга. [Finch J. T. et al, Nature, 269, 31 (1977).]

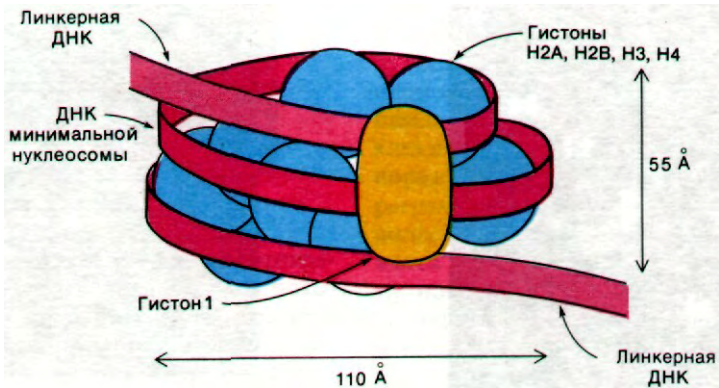


Рис. 29.8. Схематическое изображение нуклеосомы. Двойная спираль ДНК (красная полоса) намотана на октамер гистонов (по две молекулы H2A, H2B, H3 и H4; изображены голубым). Гистон H1 (желтый цвет) связывается с наружной стороной этой минимальной нуклеосомы и с линкерной ДНК. (Kornberg A., DNA Replication. Freeman and. Co., 1980.)

Таблица 29.2. Содержание ДНК в нуклеосомах

Тип клеток	Число пар оснований
Дрожжи	165
Клетки HeLa	183
Костный мозг крысы	198
Печень крысы	
Почки крысы	196
Яйцевод курицы	
Эритроциты курицы	207
Гастрюла морского ежа	218
Сперма морского ежа	241

длиной 140 пар оснований намотан снаружи на сердцевину и образует $1\frac{3}{4}$ оборота лево-закрученной суперспирали с шагом примерно 28 Å (рис. 29.8).

Как уже упоминалось, гистон H1 не всегда присутствует в нуклеосоме. Последовательность аминокислот в гистоне H1 наиболее вариабельна из всех пяти гистонов. К тому же гистон H1 отличается от других гистонов по стехиометрии: на нуклеосому приходится одна молекула гистона H1. Кроме того, гистон H1 легко отделяется от нуклеосом, что указывает на его периферическую локализацию, т.е. он не является частью гистоновой сердцевины. Нуклеосомы теряют гистон H1, когда ДНК в их составе укорачивается со 160 до 140 пар оснований. Таким образом, гистон H1 почти наверняка расположен вне нуклеосомы, ближе к линкерной ДНК. Гистон H1 может служить мостиком между различными нуклеосомами и способствовать таким образом повышению компактности хроматина.

29.6. Нуклеосома - первый уровень

конденсации ДНК

Накручивание ДНК на нуклеосомную сердцевину обеспечивает конденсацию ДНК, так как уменьшает ее линейные размеры. Участок ДНК длиной 200 пар оснований имеет в растворе длину 680 Å. В нуклеосоме это количество ДНК укладывается в частицу диаметром 100 Å. Таким образом, *плотность упаковки* (степень конденсации) нуклеосомы составляет примерно 7. Сравним ли эта величина со степенью конденсации ДНК в хромосоме? Метафазные хромосомы человека, которые находятся в сильно конденсированном состоянии, содержат $5,3 \cdot 10^9$ пар оснований, что соответствует контурной длине ДНК 180 см. Эта ДНК упакована в 46 цилиндрических структур, общая длина которых составляет 200 мкм. Таким образом, плотность упаковки ДНК в метафазных хромосомах равна приблизительно 10^4 . В интерфазных ядрах, где хроматин находится в более дисперсном состоянии, плотность упаковки для ДНК составляет примерно $10^2 - 10^3$. Очевидно, нуклеосома представляет собой лишь первый уровень конденсации ДНК.

Каков следующий уровень организации ДНК? Одна из возможностей состоит в том, что сами нуклеосомы укладываются в спираль. Например, предложена соленоидная модель хроматина диаметром 360 Å

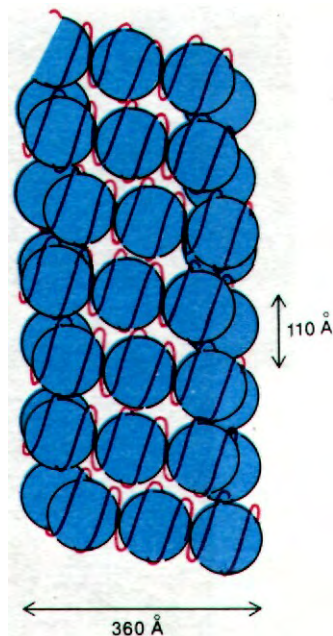


Рис. 29.9. Предполагаемая соленоидная модель хроматина. На один оборот спирали приходится шесть нуклеосом (показаны синим цветом). Двойная спираль ДНК (красная) намотана на каждую нуклеосому. [Finch J.T., Klug A., Proc. Nat. Acad. Sci., 73, 1900 (1976).]

с плотностью упаковки около 40 (рис. 29.9). Складывание таких соленоидов в петли может дать дополнительную конденсацию. По всей вероятности, в стабилизации структуры хромосомы высших порядков участвуют различные негистоновые белки. Например, в лишенных гистонов метафазных хромосомах выявляется центральный белковый остов, окруженный множеством очень длинных петель ДНК (рис. 29.10). Видимо, эти петли ДНК закреплены на остовах. Такая организация может иметь важное значение для передвижения хромосом в митозе и мейозе.

29.7. Репликация эукариотической ДНК начинается во многих местах и идет в двух направлениях

Подобно другим молекулам ДНК, эукариотическая ДНК *реплицируется полуконсерва-*

29. Хромосомы и выражение генов у эукариот

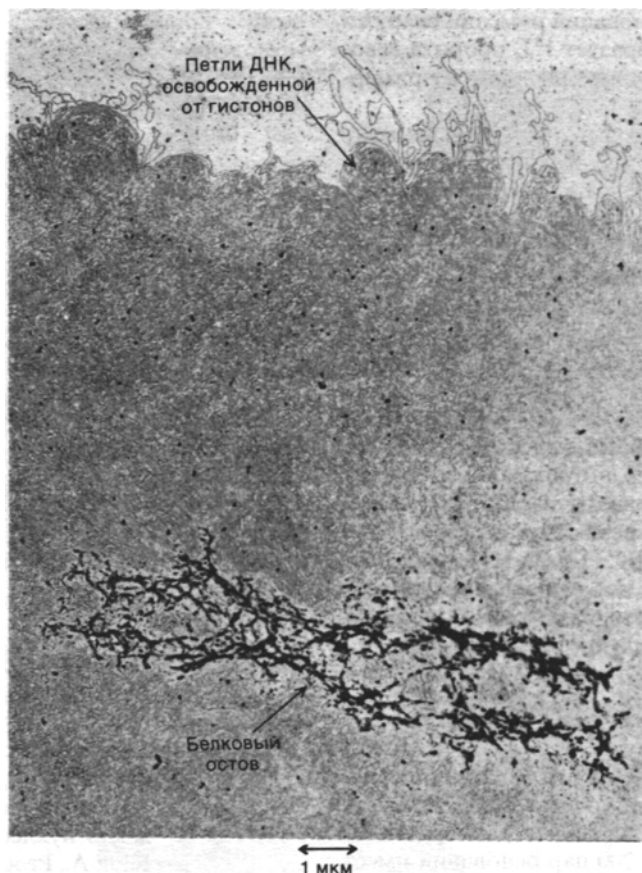


Рис. 29.10. Электронная микрофотография ДНК, с которой удалены гистоны. ДНК прикрепляется к центральному белковому остову. Гистоны удалили из метафазных хромосом клеток HeLa, обработав их полианионами. (Печатается с любезного разрешения д-ра Ulrich Laemmli.)

тивно. Кроме того, реплицированная ДНК полуконсервативно распределяется между сестринскими хроматидами метафазных хромосом (рис. 29.11). Методом электронной микроскопии было показано, что репликация эукариотической ДНК *начинается во многих точках и идет в двух направлениях.* Использование многих точек инициации необходимо для быстрой репликации, так как эукариотические ДНК имеют огромную длину. Например, самая длинная хромосо-

ма дрозофилы содержит ДНК длиной 2,1 см, или 62000 kb. Репликационная вилка ДНК дрозофилы движется со скоростью 2,6 kb/мин (сравните со скоростью движения вилки у *E. coli* 16 kb/мин). Если бы в самой большой хромосоме дрозофилы существовала только одна точка начала репликации, то ее удвоение заняло бы более 16 сут. На самом деле время репликации составляет менее 3 мин. Это достигается *кооперативным действием более чем 6000 репликационных вилок на одну молекулу ДНК.* Молекула ДНК из ядра дрозофилы, находящегося на стадии дробления, представляет собой набор следующих один за другим участков репликации, или «глаз» (рис. 29.12). Активирование каждой точки инициации порождает две расходящиеся репликационные вилки. Расширяющиеся в обоих направлениях «глаза» сливаются и образуют две дочерние молекулы ДНК (рис. 29.13). «Глаз» внутри другого «глаза» никогда не наблюдался. Из этого следует что начало репликации не может снова реактивироваться, пока не закончится реплика-

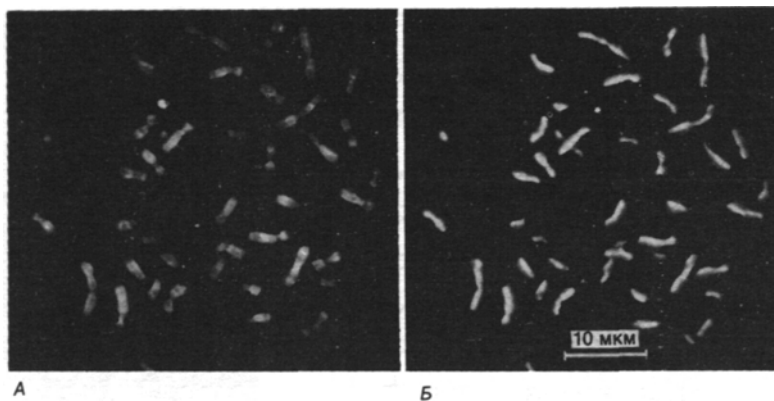


Рис. 29.11. Флуоресцентная микрофотография метафазных хромосом мужчины. ДНК в клетках дважды реплицировалась в среде, содержащей аналог тимидина 5-бромдезоксимуридин (BrdU). Хромосомы сначала окрасили хинакрином (А), отмыли и снова окрасили бис-бензимидазольным красителем Хехст 33258 (Б). BrdU тушит флуоресценцию второго красителя, поэтому сестринские хроматиды, содержащие ДНК, в которой только одна полинуклеотидная цепь замещена BrdU, флуоресцируют ярче, чем ДНК с BrdU в обеих цепях. (Печатается с любезного разрешения д-ра Samuel Latt.)

ция всей молекулы ДНК.

В эукариотических клетках имеются ДНК-полимеразы трех типов (табл. 29.3). α -Полимераза играет основную роль в репликации хромосомы, а β -фермент участвует в репарации ДНК. Когда покоящиеся клетки начинают быстро делиться, количество α -полимеразы возрастает более чем в 10 раз. γ -Полимераза отвечает за репликацию митохондриальной ДНК. Как и прокариотические ДНК-полимеразы, эти ферменты используют в качестве активированных предшественников дезоксирибонуклеозидтрифосфаты и осуществляют элонгацию затравки по матрице в направлении 5'—3'. Но в отличие от прокариот эукариотические ДНК-полимеразы не обладают

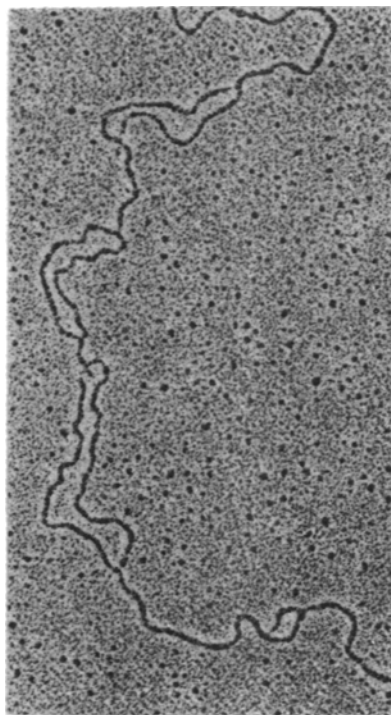


Рис. 29.12. Электронная микрофотография реплицирующейся хромосомной ДНК из дробящегося ядра эмбриона дрозофилы. «Глаза» - только что реплицированные участки. (Печатается с любезного разрешения д-ра David Hogness.)

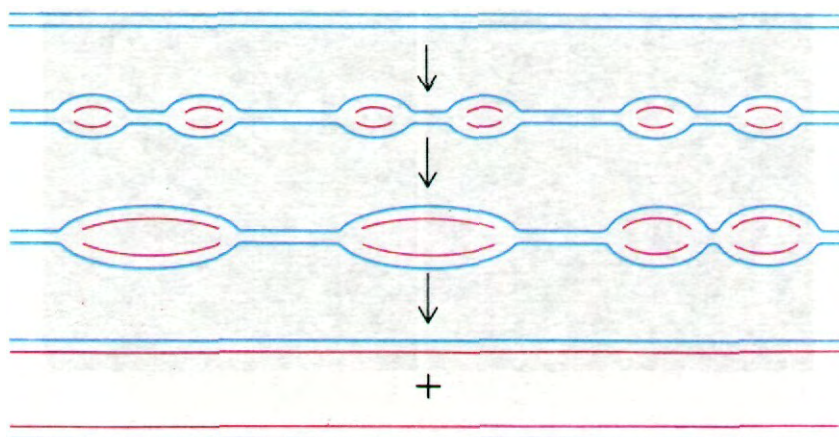


Рис. 29.13. Схематическое изображение репликации эукариотической хромосомы. Родительская ДНК показана синим цветом, новообразованная ДНК – красным.

нуклеазной активностью. Скорее всего функцию исправления ошибок выполняют нуклеазы, ассоциированные с этими полимеразы в мультиферментных комплексах.

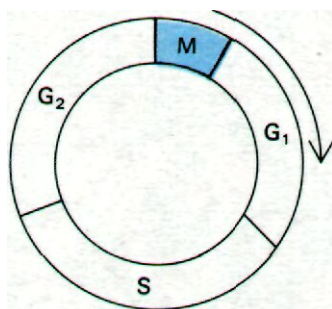


Рис. 29.14. Фазы клеточного цикла эукариотической клетки: митоз (М); фаза покоя 1, перед синтезом ДНК (G_1); период синтеза ДНК (S); фаза покоя 2, после синтеза ДНК (G_2). Продолжительность фаз зависит от типа клеток и условий культивирования. Митоз – обычно самая короткая фаза.

29.8. Новые гистоны образуют новые нуклеосомы на отстающей дочерней цепи ДНК

В репликационных вилках синтез ДНК идет в направлении $5' \rightarrow 3'$ по одной дочерней цепи и в направлении $3' \rightarrow 5'$ по другой. Как и при репликации прокариотической ДНК (разд. 24.19), это происходит следующим образом: одна цепь, ведущая, синтезируется непрерывно, а другая, отстающая, – прерывисто. Как распределяются старые и новые гистоны? Чтобы решить этот вопрос, синтез ДНК проводили в присутствии ингибитора белкового синтеза циклогексимида. В этих условиях синтез ДНК прекращается в течение примерно 15 мин. При действии ДНКазы I половина новообразованной ДНК полностью распадается, а другая половина расщепляется на фрагменты длиной 200 пар оснований. Этот эксперимент, а также данные, полученные с помощью метки тяжелыми изотопами, показали, что родительские гистоны ассоциированы только с одной из двухспиральных дочерних ДНК, тогда как другая остается голой из-за отсут-

Таблица 29.3. Эукариотические ДНК-полимеразы

Тип	Локализация	Основная функция	Масса, кДа
α	Ядро	Репликация ядерной ДНК	140
β	»	Репарация ядерной ДНК	40
γ	Митохондрии	Репликация митохондриальной ДНК	150

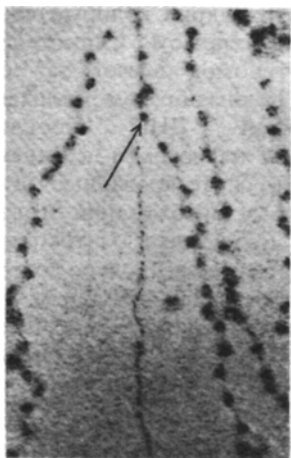


Рис. 29.15. Асимметричная репликационная вилка, возникшая в результате синтеза ДНК в присутствии циклогексимида, блокирующего образование новых гистонов. Одна из дочерних молекул ДНК покрыта бусинами, другая остается голой. Это показывает, что родительские гистоны связаны только с одной из дочерних молекул. [Riley D., Weintraub H., Proc. Nat. Acad. Sci., **76**, 331 (1979).]

ствия новых гистонов. Эта интерпретация находит прямое подтверждение на электронных микрофотографиях, где видно, что в области репликационной вилки одна из дочерних нитей покрыта бусинами, а другая - нет (рис. 29.15). Иными словами, родительские гистоны распределяются во время репликации консервативно¹. Такое поведение гистонов показывает, что гистоны не отделяются от ДНК во время репликации. *Старые гистоны остаются на двухцепочечной ДНК, содержащей ведущую цепь, тогда как новые гистоны садятся на ДНК, содержащую отстающую цепь.* Причина этого различия между дочерними молекулами ДНК заключается, очевидно, в том, что гистоны гораздо прочнее связываются с двухцепочечной ДНК, чем с одноцепочечной. Старые гистоны, по-видимому, не удержи-

ваются на отстающей цепи по той причине, что до соединения фрагментов Оказаки она содержит одноцепочечные участки.

29.9. Митохондрии и хлоропласты содержат собственную ДНК

Не вся наследственная информация эукариотических клеток содержится в ядерной хромосомной ДНК. В результате генетических исследований дрожжей был открыт митохондриальный геном, отличный от ядерного генома. В 1949 г. Борис Эфрусси (Boris Ephrussi) обнаружил, что некоторые мутанты пекарских дрожжей не способны к окислительному фосфорилированию. Эти дефектные по дыханию мутанты медленно растут за счет брожения. Они называются *petites* (что по-французски означает «маленькие»), так как образуют очень маленькие колонии. Генетический анализ привел к неожиданному открытию, что мутации *petites* сегрегируют независимо от ядра; это навело на мысль о том, что митохондрии обладают собственным геномом. И действительно, через несколько лет в митохондриях была обнаружена ДНК. Более того, митохондриальная ДНК из штамма *petite* отличалась по плавучей плотности от митохондриальной ДНК дрожжей дикого типа; из этого следовало, что у мутанта изменена значительная часть митохондриального генома. Вслед за этим было показано, что хлоропласты фотосинтезирующих эукариот тоже содержат ДНК и что она реплицируется, транскрибируется и транслируется.

Митохондриальная ДНК животных клеток - кольцевая двухцепочечная молекула с контурной длиной около 5 мкм, что соответствует 15 kb. Дрожжевая митохондриальная ДНК обычно примерно в 5 раз длиннее, а хлоропластная - в 10 раз длиннее. Молекулы ДНК в митохондриях и хлоропластах не связаны с гистонами. Они относительно невелики, сравнимы по величине с вирусными геномами. Лучше всего изучен митохондриальный геном дрожжей, кодирующий примерно десять белков, две молекулы рибосомной РНК и около 26 видов транспортной РНК. Молекулы, кодируемые митохондриальной ДНК и синтезируемые внутри этой органеллы, составляют всего около 5% митохондриального белка. Таким образом, большая часть белков митохондрии кодируется ядерным геномом. Однако

¹ Недавно этот вывод подвергался серьезной критике в связи с тем, что по некоторым данным циклогексимид нарушает нормальное распределение гистонов во время репликации. — Прим. перев.

генетический вклад митохондриальной ДНК необходим. Например, три из семи субъединиц цитохромоксидазы и три из десяти субъединиц АТФазы внутренней мем-

браны митохондрий кодируются митохондриальным геномом. Существование отдельных геномов влечет за собой ряд вопросов. Каким образом репликация митохондриальной ДНК координируется с удвоением хромосом и делением клетки? Как белки, синтезированные в цитозоле, проникают в митохондрии и взаимодействуют с продуктами митохондриальных генов? Но самое загадочное состоит в следующем: зачем митохондриям нужны собственные геномы, если 95% их белков кодируются ядерным геномом? Ответов на эти интригующие вопросы пока нет.

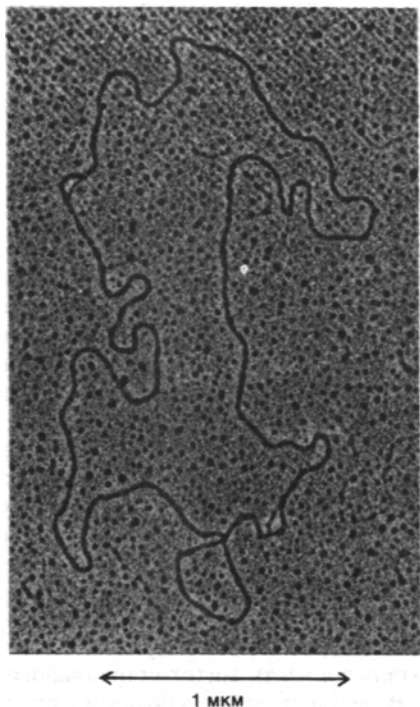
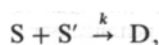


Рис. 29.16. Электронно-микроскопическое изображение молекулы митохондриальной ДНК, содержащей два генома, соединенных «голова к хвосту» с образованием кольца. Репликация этой молекулы ДНК только что началась. Стрелками показаны две петли, расположенные на противоположных сторонах кольца. Эти петли с вытесненной цепью (D-петли, от англ. displacement - вытеснение) содержат новосинтезированную ДНК. Более тонкая линия в каждой петле - вытесненный одноцепочечный участок родительской ДНК. (Печатается с любезного разрешения д-ра David Clayton.)

29.10. Эукариотическая ДНК содержит много повторяющихся последовательностей оснований

Рой Бриттен (Roy Britten) и его сотрудники исследовали кинетику реассоциации ДНК, денатурированной нагреванием, и обнаружили, что эукариотическая ДНК в отличие от прокариотической ДНК содержит много повторяющихся последовательностей оснований. В этих экспериментах ДНК дробили на короткие фрагменты и затем денатурировали нагреванием раствора выше температуры плавления ДНК ($T_{пл}$). Затем полученный раствор одноцепочечной ДНК охлаждали до температуры примерно на 25°C ниже $T_{пл}$, оптимальной для реассоциации комплементарных цепей с образованием двухспиральной ДНК. Кинетику реассоциации можно регистрировать самыми различными способами. Один из методов состоит в измерении поглощения раствора при 260 нм (разд. 24.9). При этой длине волны коэффициент поглощения двухцепочечной ДНК примерно на 40% ниже, чем соответствующая величина для одноцепочечной ДНК; это явление называется *гипохромизмом*. В основе другого экспериментального подхода лежит тот факт, что *двухцепочечная ДНК связывается колонками с гидроксипатитом (фосфатом кальция), а одноцепочечная проскакивает*. В этом методе привлекает то, что он позволяет фракционировать большие количества ДНК на основе скорости ее реассоциации после тепловой денатурации.

Наблюдаемая кинетика реассоциации ДНК *E. coli* или фага Т4 соответствует ожидаемой кинетике бимолекулярной реакции



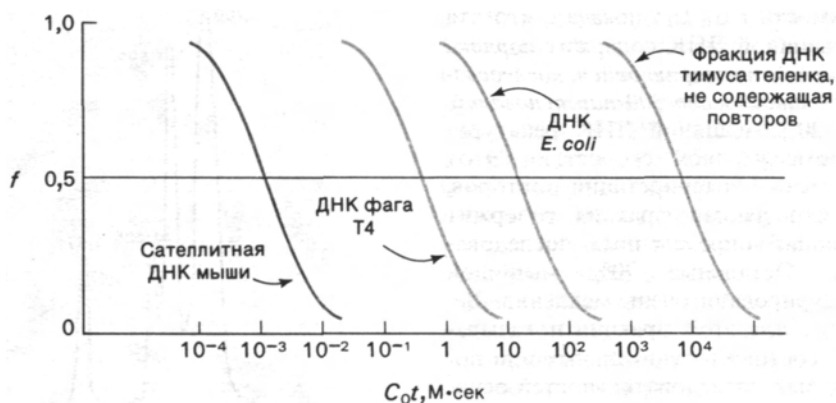


Рис. 29.17. Кривые зависимости f от C_0t («кривые C_0t ») отображают кинетику реассоциации нескольких денатурированных нагреванием ДНК. По оси ординат отложена доля одноцепочечных молекул, по оси абсцисс — C_0t . Быстрая реассоциация сателлитной ДНК мыши показывает, что она содержит огромное количество повторяющихся последовательностей. [Britten R. J., Kohne D. E., Science, **161**, 530 (1968).]

где S и S' — комплементарные одноцепочечные молекулы, D — реассоциировавшая двойная спираль и k — константа скорости ассоциации. В такой реакции доля одноцепочечных молекул f снижается со временем в соответствии с уравнением

$$f = \frac{1}{1 + kC_0t},$$

где C_0 — исходная концентрация ДНК (выраженная в молях нуклеотидов в 1 л), а t — время в секундах. Для определенной ДНК и заданных экспериментальных условий (т. е. ионной силы, температуры, размера фрагментов ДНК) f зависит только от C_0t — произведения концентрации ДНК на время. Кинетику реассоциации удобно графически изображать, откладывая зависимость f от десятичного логарифма C_0t . Такая кривая C_0t имеет сигмоидную форму (рис. 29.17). Характеристикой того или иного препарата ДНК служит величина $C_0t_{0,5}$, которую легко определить с по-

мощью этой кривой. $C_0t_{0,5}$ — значение C_0t , при котором происходит реассоциация половины ДНК ($f = 0,5$). Для ДНК *E. coli* значение $C_0t_{0,5}$ составляет примерно 9 М·с, для фага Т4 $C_0t_{0,5} = 0,3$ М·с. Эти числа показывают, что ДНК *E. coli* реассоциирует примерно в 30 раз медленнее, чем ДНК фага Т4. Объясняется это тем, что ДНК *E. coli* длиннее и число разных видов фрагментов, которые содержатся в препарате ДНК, разрушенной силами сдвига, больше, чем в препарате ДНК Т4. Итак, концентрация комплементарных фрагментов в растворе фрагментированной ДНК *E. coli* ниже, чем в растворе ДНК фага Т4 (содержащем такое же количество нуклеотидов), и, следовательно, скорость реассоциации ниже. Исследование ряда прокариотических ДНК показало, что величина $C_0t_{0,5}$ прямо пропорциональна размеру генома.

Когда с помощью этого метода стали исследовать ДНК мыши, получили неожиданный результат. Геномы млекопитающих примерно на три порядка величины больше, чем геном *E. coli*, и предполагалось, что будет получена величина $C_0t_{0,5}$ порядка 10^4 М·с. Раствор ДНК с концентрацией 10^{-4} М и с такой величиной $C_0t_{0,5}$ должен реассоциировать наполовину за 10^8 с (примерно 3 года). К удивлению исследователей, они обнаружили, что 10% ДНК мыши реассоциирует наполовину за несколько секунд. Эта фракция ДНК мыши реассоциирует быстрее, чем даже самые маленькие вирусные ДНК, и, следовательно, содержит много повторяющихся последовательностей. Анализ кри-

вой зависимости f от C_0t показал, что эта фракция мышинной ДНК содержит *порядка миллиона копий повторяющейся последовательности длиной около 300 пар оснований*. Примерно 20% мышинной ДНК ренатурирует с промежуточной скоростью. Этот факт, согласно интерпретации авторов, указывал, что данная фракция содержит 10^3 — 10^4 копий определенных последовательностей. Остальные 70% мышинной ДНК ренатурировали очень медленно. Величина $C_0t_{0.5}$ для этой фракции показывала, что она состоит из уникальных или почти уникальных последовательностей оснований.

Все изученные до настоящего времени эукариотические геномы, кроме, возможно, дрожжей, содержат повторяющиеся последовательности ДНК, тогда как прокариоты ее не содержат. Например, человеческая ДНК на 30% состоит из последовательностей, повторяющихся по меньшей мере 20 раз. Относительное содержание высокоповторяющейся, умеренно повторяющейся и уникальной ДНК различно у разных видов.

29.11. Высокоповторяющаяся ДНК (сателлитная ДНК) локализована в центромерах

Многие высокоповторяющиеся ДНК можно выделить методом центрифугирования в градиенте плотности, так как их плавающая плотность отличается от плотности основной ДНК. Например, ДНК *Drosophila virilis* дает главный пик и три сателлитных пика с меньшей плотностью (рис. 29.18). Эти сателлитные пики содержат исключительно повторяющуюся ДНК. Каждая из них представляет собой повторяющуюся последовательность гептануклеотидов:



Роль высокоповторяющейся ДНК неизвестна. Но хромосомная локализация этой фракции была определена с помощью метода *гибридизации in situ*, разработанного Джозефом Голлом и Мэри Лу Пардю (Joseph Gall, Mary Lou Pardue). Клетки иммобилизовали под тонким слоем агара

Рис. 29.18. На этой кривой седиментации видны три отчетливых пика сателлитной ДНК ($\rho = 1,692, 1,688$ и $1,671$). Показан результат равновесного центрифугирования ДНК *D. virilis* в нейтральном градиенте CsCl . [Gall J. G., Cohen E. H., Atherton D. D., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 38, 417 (1974).]

и обрабатывали щелочью для денатурации ДНК. Затем этот препарат инкубировали с меченной тритием РНК, транскрибированной *in vitro* очищенной сателлитной ДНК в качестве матрицы. Гибриды радиоактивной РНК с участками хромосомы, содержащими сателлитную ДНК, выявляли с помощью радиоавтографии (рис. 29.19). Был получен очень четкий результат: *сателлитная ДНК мыши встречается только в области центромер*. Локализация этих последовательностей и отсутствие в клетке комплементарных им РНК объясняются, по-видимому, тем, что са-

теллитные последовательности участвуют в перемещениях хромосом во время митоза и мейоза.

29.12. Гены, кодирующие рибосомные РНК, расположены один за другим тандемно и повторяются несколько сот раз

Гены, кодирующие молекулы рибосомных РНК, отличаются двумя особенностями. Во-первых, они *повторяются тандемно*



Рис. 29.19. Радиоавтограф мышинных клеток, на котором видна локализация сателлитной ДНК. (Печатается с любезного разрешения д-ра Joseph Gall.)

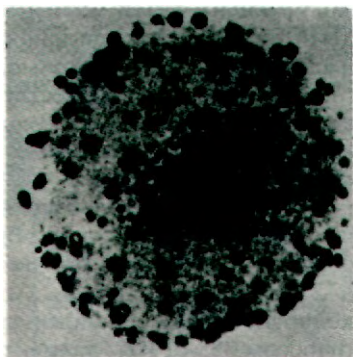


Рис. 29.20. Микрофотография ядра, выделенного из ооцита ксенопуса. Ядро окрашено, чтобы были видны сотни ядрышек, образующихся при амплификации генов рибосомной РНК. [Brown D. D., Dawid I. B., Science, 160, 272 (1968).]

один за другим. Почти у всех эукариот имеется более 100 копий этих генов. Во-вторых, большинство генов рРНК расположено в особых участках хромосом, ассоциированных с ядрышками. В клетках мутантов, лишенных ядрышек, синтезируется очень мало рРНК; поэтому они нежизнеспособны. Об этих генах многое известно, главным образом благодаря работам Мак-

са Бернстила, Доналда Брауна, Оскара Миллера (Max Birnstiel, Donald Brown, Oscar Miller) и их сотрудников. Гены, кодирующие четыре рибосомные РНК - 18S-, 5,8S-, 28S- и 5S-рРНК,- были выделены в чистом виде из ДНК африканских шпорцевых лягушек *Xenopus laevis* и *Xenopus mulleri*. Выбор пал на шпорцевых лягушек по той причине, что их ооциты содержат особенно много этих генов.

Гены 18S-, 5,8S- и 28S-рРНК собраны вместе (образуют кластеры) и тандемно повторяются. Гибридизация *in situ* показала, что эти гены расположены в ядрышках. Повторяющаяся единица состоит из *гена, кодирующего 40S-предшественник РНК и спейсер* (рис. 29.21). 40S-предшественник (8kb) модифицируется и расщепляется, давая зрелые 18S-, 5,8S- и 28S-рРНК

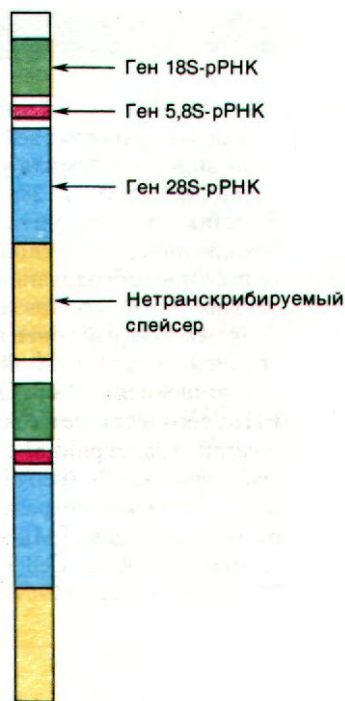


Рис. 29.21. Организация генов 40S-предшественника 18S- 5,8S- и 28S-рРНК у ксенопуса. Тандемно повторяющиеся гены разделены нетранскрибируемыми участками (спейсерами). Длина повторяющегося элемента 13 kb.

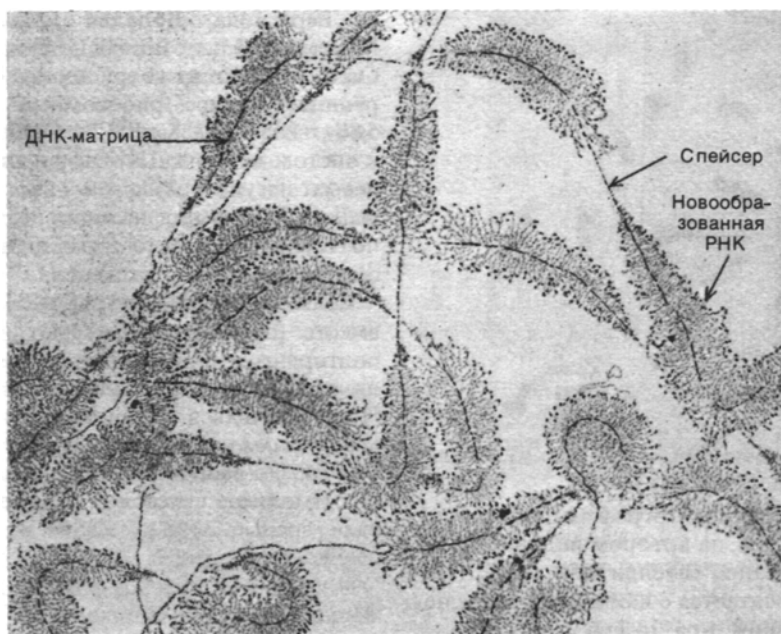


Рис. 29.22. На этой электронной микрофотографии ядрышковой ДНК ясно видна тандемная укладка генов 18S-, 5.8S- и 28S-рРНК. Толстая осевая нить - ДНК. Тонкие нити, отходящие в стороны, - новообразованные молекулы РНК со связанными белками. Острый конец каждой «елочки», образованной синтезирующимися молекулами РНК, соответствует точке инициации транскрипции. Голые участки между острыми концами «елочек» - нетранскрибируемые спейсеры. [Miller O. L., Jr., Beatty B. R., J. Cell Physiol., 74 (suppl. 1), 225 (1969).]

и дают примерно $2 \cdot 10^6$ копий. Количество генов, кодирующих рРНК, достигает 75% всей ДНК ооцита. Амплифицированная ДНК представляет собой внехромосомные кольца, прикрепленные к множеству новых ядрышек. Такая *избирательная амплификация гена* позволяет ооцитам накопить 10^{12} рибосом, необходимых для очень быстрого синтеза белка во время дробления. Если бы амплификации гена не было, образование 10^{12} рибосом заняло бы несколько веков!

Ген, кодирующий самую маленькую молекулу рибосом - 5S-рРНК, также тандемно повторяется. И соматические клетки, и ооциты содержат около 24000 копий этого гена, кодирующего молекулу РНК длиной 120 нуклеотидов. Эти гены собраны в группы (в кластеры) и располагаются на концах большинства хромосом лягушки. И в этом случае между генами данной рРНК имеется область нетранскрибируемого спейсера (рис. 29.23). На самом деле спейсер в несколько раз длиннее самого гена. Любопытно, что он содержит нетранскрибируемый псевдоген, последовательность оснований которого сходна с самим геном. Роль спейсера в этом и в других эукариотических генах остается загадкой.

(разд. 29.21). Спейсер (нетранслируемый участок) не транскрибируется (рис. 29.22). Соматические клетки лягушек содержат примерно 500 копий этой повторяющейся единицы, и все они расположены друг за другом. В процессе оогенеза происходит удивительная избирательная амплификация (увеличение количества) этих генов. Они реплицируются несколько тысяч раз

29.13. Гены гистонов собраны вместе и повторяются тандемно много раз

Как организованы гены, кодирующие белки? Одними из первых были выделены и охарактеризованы гены гистонов благодаря изобилию гистоновой мРНК в быстро делящихся эмбрионах морского ежа. Эти морские беспозвоночные развиваются от стадии зиготы до стадии бластулы, содержащей 1000 клеток, за 10 ч. Поэтому для сборки нового хроматина необходимо синтезировать большое количество гистонов. Действительно, в период раннего эмбриогенеза гистоны составляют более четверти всего синтезированного белка. Гистоновая мРНК содержится в еще большем количестве - на ее долю приходится около 70% всех информационных РНК, синтезируемых на этой стадии, поэтому ее сравнительно легко выделить. После выделения гистоновой мРНК была исследована кинетика ее гибридизации с ДНК морского ежа для определения числа копий гистоновых генов. Скорость гибридизации была в несколько сот раз выше, чем она должна быть в случае уникальных последовательностей: это показывало, что для гистоновых генов характерна очень высокая повторяе-

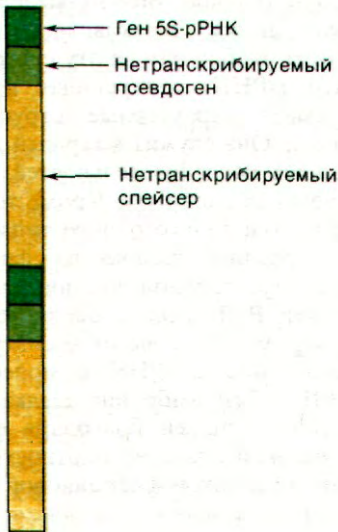


Рис. 29.23. Организация генов 5S-рРНК *Xenopus laevis*. Эти тандемно повторяющиеся гены также разделены нетранскрибируемыми спейсерами. Повторяющийся элемент имеет длину примерно 750 пар оснований.

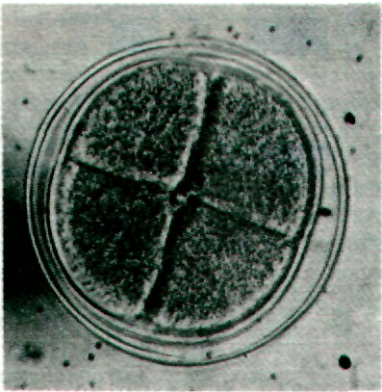


Рис. 29.24. Световая микрофотография эмбриона морского ежа на стадии четырех клеток. (Печатается с любезного разрешения д-ра Annamma Spudich.)

мость. Число копий гистоновых генов у различных видов морского ежа колеблется от 300 до 1000. У других организмов повторяемость ниже (табл. 29.4). Число копий гистоновых генов у того или иного организма, по-видимому, коррелирует с потребностью в быстром синтезе гистоновых мРНК.

Как организованы в геноме многократно повторяющиеся гены гистонов? Для получения фракции ДНК, обогащенной генами гистонов, использовали тот факт, что эти гены содержат больше пар G—C (55%), чем большая часть ДНК морского ежа (42%), и, следовательно, имеют более высокую плавающую плотность. При расщепле-

Таблица 29.4. Повторяемость гистоновых генов¹

Вид	Число копий
Морской еж	300-1000
Плодовая мушка (<i>Drosophila melanogaster</i>)	110
Шпорцевая лягушка (<i>Xenopus laevis</i>)	20-50
Мышь	10-20
Курица	10
Человек	30-40

¹ У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* имеется только два гистоновых гена на гаплоидный геном.- Прим. перев.

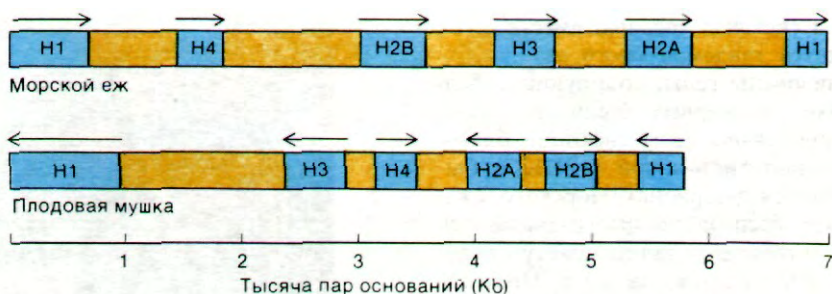


Рис. 29.25. Карта сгруппированных в кластеры гистоновых генов морского ежа (*Strongylocentrotus purpuratus*) и плодовой мушки (*Drosophila melanogaster*). Кодировующие участки закрашены синим цветом, спейсеры (нетранскрибируемые участки) - желтым. Стрелки показывают направление транскрипции.

нии такой обогащенной ДНК одной из рестриктирующих эндонуклеаз получались фрагменты длиной 7kb, которые гибридизовались с гистоновой мРНК. Затем эти фрагменты клонировали в клетках *E. coli* и исследовали с помощью ферментов рестрикции и электронной микроскопии. Результаты исследований показали, что *гены, кодирующие пять основных гистонов, сгруппированы вместе в составе основного повторяющегося элемента длиной 7 kb* (рис. 29.25). В этом повторяющемся элементе пять кодирующих участков чередуются с пятью спейсерами. Кодировующие последовательности не прерываются вставочными последовательностями в отличие от других эукариотических генов, описанных выше (разд. 26.12). *Группа из пяти гистоновых, генов повторяется тандемно много раз*. Повторы очень сходны друг с другом, но не идентичны. Это согласуется с тем, что гистоны H1, H2A и H2B представляют собой группы очень сходных белков, а не совершенно однородные полипептиды. В различных тканях и на разных стадиях развития экспрессируются различные гистоновые гены.

Какова функциональная роль такой организации генов? Их повторяемость, несомненно, имеет важное значение для быстрого синтеза большого количества ги-

стоновой мРНК. Но причина, по которой повторы собраны тандемно вместе, не очень ясна. Соседство генов, кодирующих пять гистонов, может быть, играет важную роль в координации их синтеза, чтобы гистоны H2A, H2B, H3 и H4 образовывались в эквимольном количестве, а гистон H1 - в половинном.

29.14. Многие белки, синтезирующиеся в больших количествах, кодируются уникальными генами

Мы уже видели, что гены рибосомных РНК и гистонов повторяются много раз. Представлены ли гены, кодирующие большое количество продукта, большим числом копий? Для ответа на этот вопрос Доналд Браун (Donald Brown) выделил ген фиброина шелка шелковичного червя *Bombyx mori*. Выбор пал на эту систему потому, что мРНК, кодирующая фиброин шелка, имеет характерные структурные особенности. Она служит матрицей для повторяющихся последовательностей аминокислот, богатых глицином. Кроме того, гигантские клетки только одного типа синтезируют огромные количества фиброина шелка на определенной стадии развития. Для очистки РНК использовали ее большой размер (9,1 kb) и высокое содержание G по сравнению с рРНК и молекулами других РНК. Ген фиброина шелка также был частично очищен благодаря его необычно высокой плавучей плотности. Гибридизация очищенной фиброиновой мРНК с ДНК показала, что *в гаплоидном геноме имеется только один ген фиброина шелка*.

Этот результат имел чрезвычайно важное значение для изучения экспрессии генов и дифференцировки у эукариот. Он показал, что большие количества одного определенного белка могут быть синтезированы, даже если в геноме имеется только одна копия кодирующего его гена. *Единственный ген фиброина шелка служит*

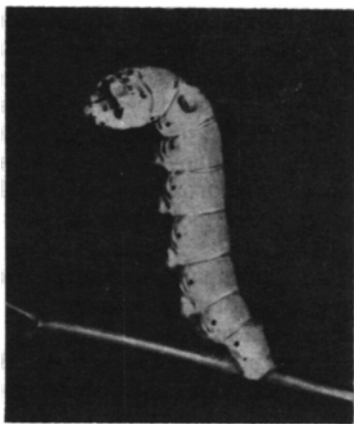


Рис. 29.26. Шелковичный червь (Фотография любезно представлена д-ром Karen Sprague.)

матрицей для синтеза примерно 10^4 молекул мРНК, сохраняющихся в течение нескольких дней. Каждая молекула мРНК служит матрицей для синтеза порядка 10^5 молекул белка. Таким образом, одного гена хватает для синтеза порядка 10^9 молекул белка в течение четырех дней. Создается впечатление, что повторяющиеся гены рибосомных РНК и гистонов скорее представляют собой исключение, чем правило. Единственный ген фибрина шелка гораздо типичнее для генов, кодирующих белки, даже белки, синтезирующиеся в больших количествах. Например, ретикулоциты содержат одну или несколько копий генов, кодирующих субъединицы гемоглобина (разд. 29.26). Подобно этому, большие количества овальбумина - основного компонента яичного белка - синтезируются в яйцеводе пасущихся кур, клетки которого содержат только одну копию овальбуминового гена на гаплоидный геном. Однако не следует упускать из виду и возможность избирательной амплификации гена как способ увеличения синтеза того или иного белка в клетках определенного типа. Некоторые опухолевые клетки в культуре приобретают устойчивость к аналогам фолиевой кислоты путем синтеза 200-кратного количества дигидрофолат-редуктазы по сравнению с нормальными чувствительными клетками. Такое количество фермента возникает вследствие *избирательной амплификации* гена дигидрофолат-редуктазы. Очевидно, эукариотический геном представляет собой весьма динамичную систему.

29.15. Большинство уникальных генов перемежается повторяющимися последовательностями

Примерно 70% ДНК самых разнообразных эукариот представляет собой уникальные последовательности. Как расположены эти уникальные гены относительно повторяющихся последовательностей? Анализ эукариотических хромосом различными методами показал, что *уникальные последовательности обычно чередуются с умеренно повторяющимися последовательностями, длина которых в типичном случае составляет 300 пар оснований*. Существует несколько тысяч различных умеренно повторяющихся последовательностей. Они повторяются в геноме несколько сот раз и в совокупности составляют 20% ДНК. Функция рассеянных, умеренно повторяющихся последовательностей ДНК неизвестна. Возможно, они служат участками связывания специфических регуляторных макромолекул, которые могут контролировать транскрипцию соседних уникальных структурных генов.

29.16 Почти все гены высших эукариот, кодирующие белки, имеют разорванное строение

Существование у эукариот повторяющихся генов и их чередование с уникальными генами не имеют никаких аналогий у прокариот. Еще одно удивительное отличие в организации генома - *присутствие у высших эукариот вставочных последовательностей практически во всех генах, кодирующих белки*. Как уже обсуждалось (разд. 26.12), эти вставочные последовательности (*интроны*) транскрибируются вместе с кодирующими последовательностями (*экзонами*), а затем удаляются в процессе образования зрелой мРНК. Число интронов в изученных до сих пор разорванных генах колеблется от 2 до 17 (табл. 29.5 и рис. 29.27)¹. Некоторые интроны имеют большую длину. Например, ген β -глобина мыши содержит интрон длиной 550 пар оснований, т.е. он длиннее, чем его экзоны. Два фрагмента иммуноглобулинового гена разделены еще более длинным интроном - длиной 1250 пар оснований. В неко-

¹ Ген миозина содержит свыше 50 интронов! — Прим. перев.

29. Хромосомы и выражение генов у эукариот



Рис. 29.27. Карта гена кональбумина. Вставочные последовательности (интроны), которые транскрибируются, но не входят в состав зрелой мРНК, показаны желтым цветом.

торых генах общая длина интронов превышает длину экзонов. Так, ген овальбумина содержит около 7700 пар оснований, а его мРНК имеет длину всего 1859 нуклеотидов. *Как правило, вставочные последовательности разорванных генов длиннее, чем экспрессирующиеся последовательности.* Интересно отметить, что эволюционные изменения в последовательностях интронов происходят быстрее, чем в экзонах. Последовательности оснований меньшего интрона генов β -глобина мыши и кролика совершенно различны. Однако по длине они близки, а их положение в гене идентично. Еще более существенно, что последовательности на стыке интронов и экзонов, по которым происходит сплайсинг (сращивание), консервативны.

Были обнаружены и разорванные гены, кодирующие РНК. Например, один из генов транспортных РНК дрожжей содержит интрон длиной 14 пар оснований рядом с антикодоновой петлей зрелой тРНК. Митохондриальный ген, кодирующий рибосомную РНК, также имеет разорванное строение. В то же время многие рРНК и тРНК непрерывны. Гены гистонов морского ежа и плодовой мушки, по-видимому, также не содержат вставочных последовательностей. До настоящего времени такие «разорванные» структурные гены были обнаружены только у птиц и млекопитающих. Интересно выяснить, много ли разорванных генов у низших эукариот¹.

Открытие разорванных генов было полной неожиданностью и повлекло за собой возникновение ряда увлекательных проблем. Может быть, интроны отражают образование в эволюции новых белков из

фрагментов старых? Участвуют ли интроны в регуляции выражения генов? Ясно, что появилась новая важная область исследований. Быстро накапливаются данные, касающиеся существенного вопроса - вырезания вставочных последовательностей из первичного транскрипта. Вскоре мы рассмотрим эти данные.

29.17. РНК в эукариотических клетках синтезируется тремя различными РНК-полимеразами

Перейдем теперь к транскрипции. В эукариотических клетках существует три вида РНК-полимераз, синтезирующих РНК. Они различаются по специфичности к матрице, локализации и чувствительности к ингибиторам. Полимераза типа I локализована в ядрышках, где она транскрибирует тандемные повторы, кодирующие рибосомные 18S-, 5.8S- и 28S-РНК. Другие молекулы РНК - 5S-рРНК и все тРНК - синтезируются другой РНК-полимеразой типа III, которая находится не в ядрышке, а в нуклеоплазме. Большие молекулы РНК-предшественники, из которых образуются мРНК, синтезируются РНК-полимеразой II, также содержащейся в нуклеоплазме. У прокариот же все виды клеточной РНК синтезируются одной и той же РНК-полимеразой. Общее свойство эукариотических РНК-полимераз заключается в том, что в их состав входят две большие и несколько маленьких субъединиц.

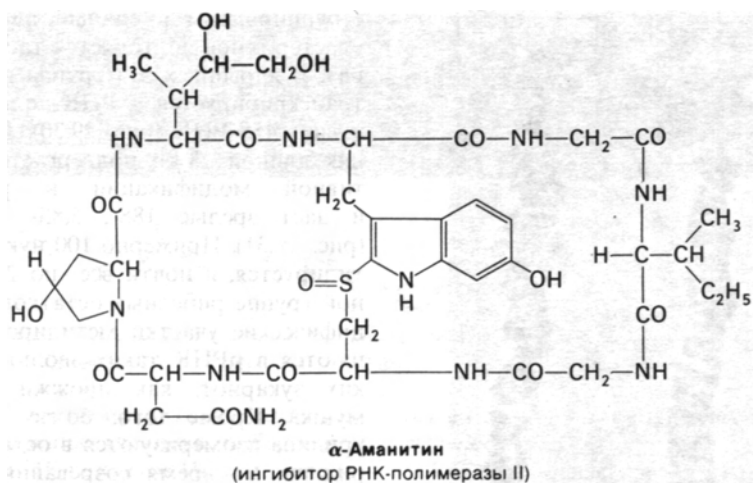
29.18. Грибной яд α -аманитин - мощный ингибитор РНК-полимеразы II

Каждый год во всем мире более 100 человек погибает от отравления ядовитыми грибами, в частности *Amanitia phalloides*, (бледной поганкой). Один из токсинов этих

Таблица 29.5. Некоторые эукариотические гены, имеющие разорванное строение

Ген	Число интронов	Ген	Число интронов
Овальбумин	7	β -Глобин	2
Овомукоид	6	δ -Глобин	2
Кональбумин	17	L-цепь иммуноглобулина	2
α -Глобин	2	H-цепь иммуноглобулина	4

¹ В настоящее время вырисовывается следующая тенденция: чем выше эволюционное положение организма, тем, как правило, больше интронов содержит его гены и тем они длиннее.—Прим. перев.



грибов - *α-аманитин* - циклический пептид, содержащий несколько необычных аминокислот. *α-Аманитин* очень прочно связывается с РНК-полимеразой II ($K = 10^8$ М) и блокирует таким образом синтез предшественников мРНК. Полимераза III ингибируется при более высоких концентрациях *α-аманитина* (10^6 М), а полимеразы I не чувствительна к этому токсину. *α-Аманитин* блокирует стадию элонгации в синтезе РНК.

Каждой политенной хромосоме имеется ряд характерных полос (диски, или хромомеры), видимых под световым микроскопом. При развитии личинки в куколку некоторые диски временно увеличиваются (образуют пuffy), так как ДНК в этой области переходит из конденсированного состояния в разрыхленное (рис. 29.29). *Пuffy* соответствуют транскрипционно активным участкам. Был обнаружен поразительный факт: пuffy могут быть индуциро-

29.19. Специфические гены могут активироваться для транскрипции

Выражение генов у эукариот, как и у прокариот, регулируется в значительной степени на уровне транскрипции. Одно из наиболее надежных доказательств было получено при исследовании хромосом развивающихся насекомых. Гигантские *полицентные хромосомы* из слюнных желез *Drosophila* содержат более тысячи молекул ДНК, не разошедшихся при репликации и лежащих бок о бок друг с другом. В ка-

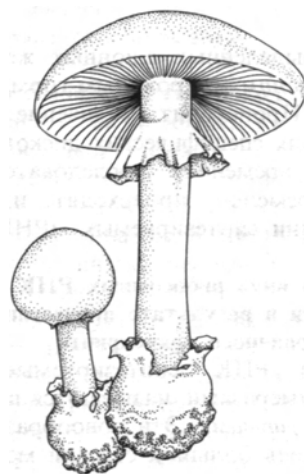


Рис. 29.28. Ядовитый гриб *Amanita phalloides*, содержащий *α-аманитин*. (Lincoff G., Mitchell D. H., Toxic and Hallucinogenic Mushroom Poisoning, Van Nostrand Reinhold, 1977, p. 30.)

Таблица 29.6. Эукариотические РНК-полимеразы

Тип	Локализация	Клеточные транскрипты	Вирусные транскрипты
I	Ядрышко	18S-, 5.8S- и 28S-рРНК	Не обнаружены
II	Нуклеоплазма	Предшественники мРНК и гРНК	Предшественники мРНК
III	Нуклеоплазма	тРНК и 5S рРНК	Малые РНК

29. Хромосомы и выражение генов у эукариот

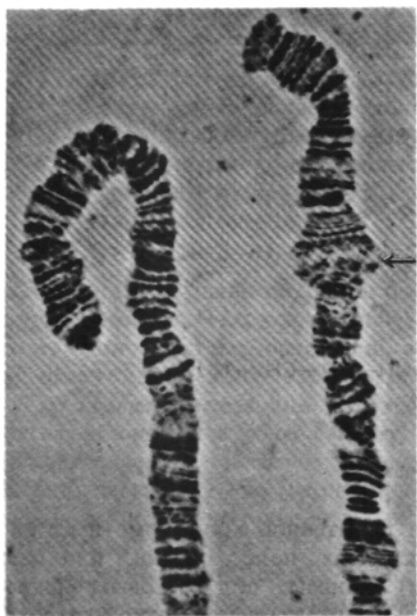


Рис. 29.29. Образование пуфа в политенной хромосоме на определенной стадии развития. Стрелкой показан наиболее крупный пуф в хромосоме дрозофилы. (Печатается с любезного разрешения д-ра Joseph Gall.)

ваны в выделенных слюнных железах *in vitro* экдизоном - стероидным гормоном насекомых. Происходит увеличение и затем конденсация специфических дисков в определенной временной последовательности, и одновременно происходят изменения в популяции синтезируемых мРНК.

29.20. Три вида рибосомных РНК образуются в результате процессинга одного первичного транскрипта

Молекулы РНК, синтезируемые тремя РНК-полимеразами, называются *первичными транскриптами*. Эти новообразованные РНК в очень большой степени модифицируются в ядре, прежде чем они переходят в цитозоль в виде зрелых молекул рРНК, тРНК и мРНК. Образование рибосомных РНК из первичного транскрипта было изучено детально, лучше, чем процессинг каких-либо других видов РНК. Выше уже обсуждалось, что гены 18S-, 5,8S- и 28S-рРНК

группированы в единый кластер и этот кластер генов повторяется тандемно много раз. В ядрышках эта группа из трех генов транскрибируется РНК-полимеразой I и дает 45S-РНК (рис. 29.30). Предшественник длиной 13 kb подвергается ферментативной модификации и расщеплению и дает зрелые 18S-, 5,8S- и 28S-рРНК (рис. 29.31). Примерно 100 нуклеотидов метилируется, и почти все - по 2'-гидроксильной группе рибозных остатков. Высокоспецифические участки метилирования сохраняются в рРНК таких эволюционно далеких эукариот, как дрожжи и плодовая мушка. Кроме того, более 100 остатков уридина изомеризуются в остатки псевдоуридина. Во время созревания происходит ассоциация множества рибосомных белков с этими РНК и их предшественниками. Возможно, именно взаимодействие РНК с рибосомными белками делает определенные участки чувствительными к действию нуклеаз.

29.21. Информационные РНК избирательно образуются из больших ядерных предшественников РНК (гетерогенной ядерной РНК, гяРНК)

Образование рибосомных РНК у эукариот сходно с ее образованием у прокариот (разд. 25.17). В то же время между эукариотическими и прокариотическими мРНК имеются существенные различия.

1. *Первичные транскрипты у эукариот не используются непосредственно в качестве мРНК.* Прежде чем они переходят из ядра в цитозоль, они подвергаются процессингу. *Трансляция и транскрипция у эукариот разобщены во времени и в пространстве, тогда как у прокариот они тесно сопряжены.*

2. Первичные транскрипты у эукариот имеют в длину от 2 до 20 kb, в связи с чем их называют *гетерогенной ядерной РНК (гяРНК)*. Обычно эти первичные транскрипты в несколько раз длиннее, чем мРНК, которые из них получают. Образование эукариотических мРНК сопряжено со сплайсингом и расщеплением. До сих пор неизвестно, выполняет ли гяРНК еще какую-нибудь роль, кроме того, что она служит предшественником мРНК.

3. Эукариотические мРНК содержат на 5'-конце «*колчачки*» (кэпы), которые представляют собой модифицированные нуклеотиды. Кроме того, большинство мРНК не-

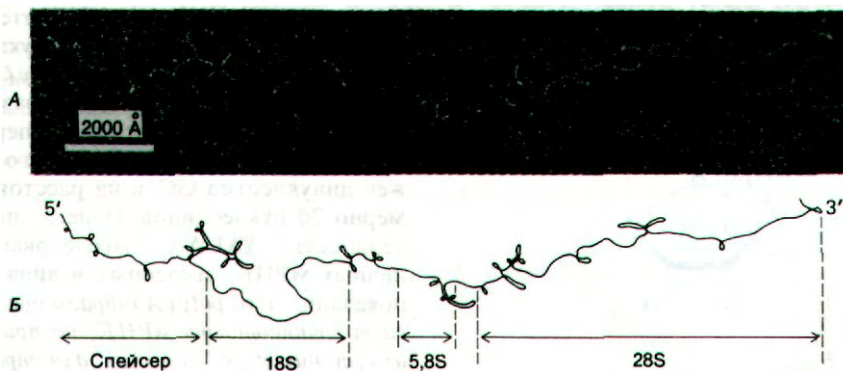


Рис. 29.30. Если расправить молекулу 45S-предшественника рибосомной РНК из клеток HeLa и исследовать ее с помощью электронного микроскопа, видна весьма характерная картина шпилек и петель. Благодаря этому можно картировать расположение молекул 28S- и 18S-РНК, образующихся из этого предшественника. *А* - электронная микрофотография 45S-предшественника. *Б* - схематическое изображение молекулы, изображенной на рис. *А*. [Wellauer P. K., Dawid I. B., Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 2828 (1973).]

сет на 3'-конце длинную *poly(A)*-последовательность.

4. Эукариотические мРНК *моноцистронны*, т.е. они являются матрицами для синтеза только одной полипептидной цепи. Многие прокариотические мРНК, наоборот, *полицистронны* (например, мРНК лактозного оперона - матрица для синтеза трех полипептидных цепей).

5. Популяция молекул мРНК эукариотической клетки зависит не только от скорости транскрипции определенных генов; в эукариотических клетках имеется и еще один уровень принятия решений; *должен ли тот или иной первичный транскрипт подвергнуться деградации или процессингу с образованием зрелой мРНК и последующим транспортом ее в цитозоль*¹.

29.22. На 5'-конце мРНК находятся «колпачки», а на 3'-конце, как правило, *poly(A)*-последовательности

5'-конец всех известных эукариотических мРНК (но не тРНК или рРНК) модифицирован особым образом. К мРНК присоединен 7-метилгуанилат необычной пирозинфосфатной связью 5'—5' (рис. 29.32). Эта характерная структура называется «колпачком». Она присоединяется к первичному транскрипту. 5'-трифосфатный конец новообразованной цепи гидролизует до дифосфата, и на него переносится остаток гуанилата GTP. Затем N-7 этого концевого гуанина метилируется S-аденозилметиони-

¹ Следует указать еще одно важное отличие прокариотических мРНК от эукариотических — время жизни. У прокариот оно составляет не более нескольких минут, а у эукариот — десятки минут или часы, а в исключительных случаях недели и месяцы. - *Прим. перев.*

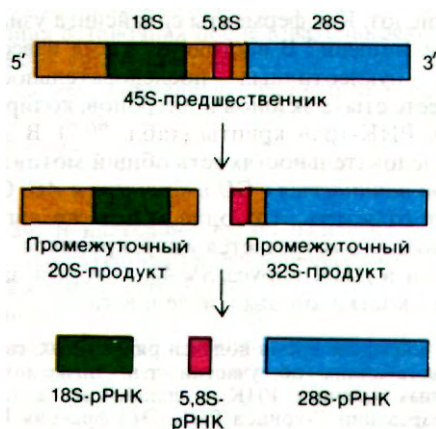


Рис. 29.31. Образование рибосомной РНК млекопитающих из первичного транскрипта. Спейсерные участки показаны желтым.

29. Хромосомы и выражение генов у эукариот

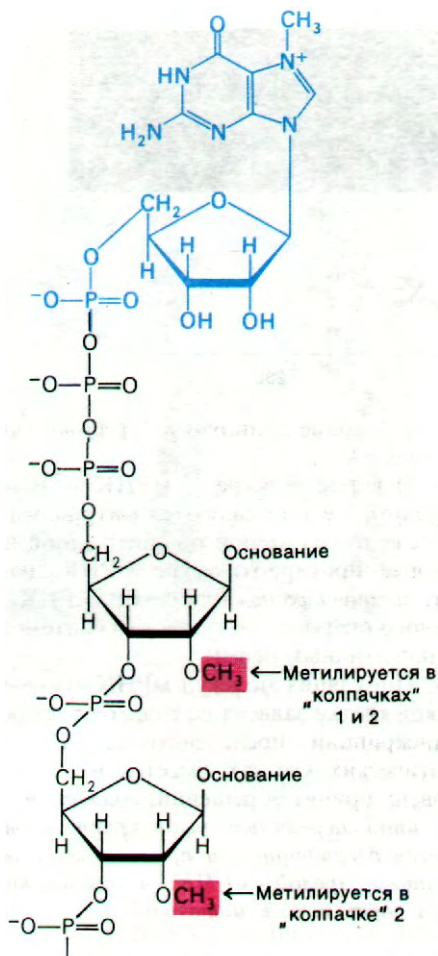


Рис. 29.32. Структура «колпачков», расположенных на 5'-конце эукариотических мРНК. Все «колпачки» содержат 7-метилгуанилат (изображен синим цветом), присоединенный пиродифосфатной связью к 5'-концу. В «колпачке» 0 ни одна рибоза не метилирована, в «колпачке» 1 метилирована одна рибоза, в «колпачке» 2 – две.

ном и образуется так называемый «колпачок» 0. Соседние остатки рибозы могут быть метилированы, при этом образуется «колпачок» 1 или «колпачок» 2 (рис. 29.32). Эти «колпачки» способствуют стабилизации мРНК, защищая их 5'-концы от фосфатаз и нуклеаз. Кроме того, «колпачки» повышают эффективность трансляции мРНК

в эукариотических системах синтеза белка.

Кроме того, большинство эукариотических мРНК имеет на 3'-конце *poly(A)*-последовательности. *Poly(A)*-полимераза присоединяет 150-200 нуклеотидов к первичному транскрипту, на 3'-конце которого расположен динуклеотид GC, а на расстоянии примерно 20 нуклеотидов от него – последовательность AAUAA. Исследования различных мРНК, введенных в яйца *Xenopus*, показали, что *poly(A)*-фрагмент увеличивает стабильность мРНК, но при этом не имеет никакого значения для трансляции. Кроме того, отсутствие *poly(A)* на конце гистоновых мРНК показывает, что он не обязательно должен присутствовать в мРНК для ее транспорта из ядра в цитозоль.

29.23. Ферменты сплайсинга с высокой точностью удаляют интроны из первичных транскриптов разорванных генов

При сплайсинге (расщепление с последующим сращиванием) мРНК происходит разрыв двух фосфодиэфирных связей и образование одной новой. Эндонуклеазная и лигазная активности, вероятно, содержатся в одном ферментном комплексе, и последовательные реакции сплайсинга согласованы между собой. В настоящее время многие лаборатории пытаются выделить ферменты сплайсинга. Очевидно, их действие должно обладать высокой точностью. Ошибка в точке сплайсинга на один нуклеотид приведет к сдвигу рамки считывания в сторону 3'-конца от этого места, что даст совершенно иную последовательность аминокислот. Как ферменты сплайсинга узнают свои мишени? В настоящее время известен ряд нуклеотидных последовательностей в месте стыка экзонов и интронов, кодирующих РНК-транскрипты (табл. 29.7). В этих последовательностях есть общий мотив: *интрон начинается с GU и кончается AG*. Следует отметить, что один и тот же сигнал сплайсинга встречается у кур, кроликов, мышей и в ДНК вируса SV-40, который заражает клетки обезьян и человека¹.

¹ В последнее время получен ряд данных, свидетельствующих об участии т.н. низкомолекулярных ядерных РНК в сплайсинге, а также в созревании 3'-концов РНК. Эта фракция РНК исследуется уже давно. Она весьма консервативна и содержит последовательности, комплементарные участкам экзонов, прилежащим к интронам. Низкомолекулярные ядерные РНК, по-видимому, обеспечивают узнавание участков сплайсинга соответствующими ферментами. – *Прим. перев.*

Таблица 29.7. Последовательности оснований транскриптов, содержащих интроны, вблизи участков сплайсинга

Участок гена	Экзон	Интрон	Экзон
Овальбумин, интрон 2	U A A G G U G A	~~~~~	A C A G G U U G
Овальбумин, интрон 3	U C A G G U A C	~~~~~	U C A G U C U G
β-Глобин, интрон 1	G C A G G U U G	~~~~~	U C A G G C U G
β-Глобин, интрон 2	C A G G G U G A	~~~~~	A C A G U C U C
Иммуноглобулин λ ₁ , интрон 1	U C A G G U C A	~~~~~	G C A G G G G C
Ранний Т-антиген вируса SV-40	U A A G G U A A	~~~~~	U U A G A U U C

В молекулах транспортной РНК точки сплайсинга окружены совершенно другими последовательностями. Из этого, очевидно, следует, что существует по крайней мере два фермента сплайсинга: один для образования мРНК, другой - тРНК. Процесс сплайсинга тРНК, по-видимому, очень сходен у эволюционно далеких видов. Клонированные гены одной из дрожжевых тРНК вводили в ооциты *Xenopus* с помощью микроинъекции для того, чтобы выяснить, может ли ген одноклеточного эукариота транскрибироваться, а его продукт - процессироваться в клетке амфибии. Самое поразительное, что в клетке *Xenopus* происходят транскрипция дрожжевого гена и правильный процессинг его продукта, несмотря на то что гены этой тРНК у двух видов совершенно различны. В частности, 14-нуклеотидная вставочная последовательность правильно удаляется (рис. 29.33). Итак, *специфичность ферментов сплайсинга сохранилась на протяжении огромного периода эволюции.*

29.24. В настоящее время известны последовательности оснований многих информационных РНК
Многие эукариотические мРНК были выделены в очищенном виде. У некоторых из них была определена последовательность оснований. Выделение какой-либо мРНК начинается с выбора клеток, в которых она содержится в большом количестве. Например, ретикулоциты богаты глобиновой мРНК, яйцеводы кур - мРНК овальбумина, плазматические клетки - мРНК иммуноглобулинов, эмбрионы морского ежа - мРНК гисто-

нов. Выделение мРНК начинается с получения клеточного экстракта, из которого удаляют белки и ДНК. Затем большую часть мРНК отделяют от других видов РНК, используя наличие в них poly(A)-фрагментов. Эти мРНК прочно связываются с колонками, содержащими ковалентно привязанные полинуклеотиды poly(U) и poly(T). После элюции с такой аффинной колонки мРНК ее можно фракционировать по размеру молекул методом гель-электрофореза или седиментации. Другой способ выделения индивидуальной мРНК - иммунопреципитация. Например, если добавить в белоксинтезирующий экстракт антитела, специфичные к овальбумину, это переведет в осадок полисомы, содержащие овальбуминовую мРНК. Для того чтобы проверить препарат мРНК, его добавляют в бесклеточную систему синтеза белка, которая работает только в присутствии экзогенной РНК. Для этого часто используются экстракты проростков пшеницы.

Наличие очищенных индивидуальных мРНК открывает возможности для ряда интересных экспериментов. Во-первых, с помощью метода гибридизации соответствующей мРНК (или комплементарной ей ДНК-копии) с хромосомной ДНК можно определить число определенных генов в геноме. Во-вторых, можно идентифицировать фрагменты ДНК, содержащие данный ген, гибридизуя их с мРНК. Затем эти фрагменты можно клонировать (разд. 31.11), чтобы получить сам ген и прилегающие к нему участки хромосомы в большом коли-

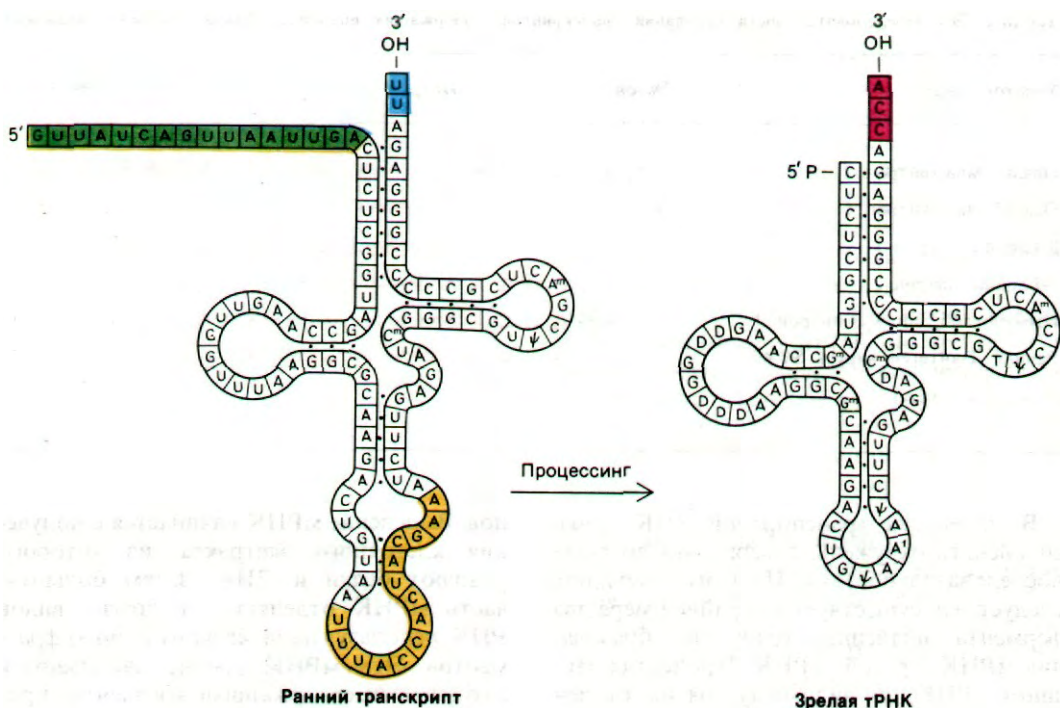


Рис. 29.33. Процессинг предшественника дрожжевой тирозиновой тРНК. Происходит удаление 14-нуклеотидной вставочной последовательности (показано желтым цветом), и ряд оснований модифицируется. Продукт длиной 92 нуклеотида получается из первичного транскрипта длиной 108 нуклеотидов путем отщепления 5'-концевой лидерной последовательности и присоединения ССА к 3'-концу.

честве. В-третьих, с помощью электронной микроскопии можно выявить вставочные последовательности в этом гене (разд. 26.12). В-четвертых, можно определить последовательность нуклеотидов мРНК, чтобы идентифицировать регуляторные сигналы.

Недавно была определена последовательность овалбуминовой мРНК. Эта мРНК содержит 1859 нуклеотидов на участке от «колпачка» на 5'-конце до *poly(A)* на 3'-кон-

це (рис. 29.34). 1158 нуклеотидов, кодирующих белок, обрамлены с обеих сторон нетранслируемыми последовательностями. С 5'-стороны она короче, чем с 3'-стороны. Нетранслируемый 5'-концевой участок длиной 64 нуклеотида содержит «колпачок», инициирующий кодон AUG, взаимодействует с белоксинтезирующим аппаратом и участвует в инициации синтеза белка. Весьма многозначителен тот факт, что этот участок содержит последовательность, комплементарную 3'-концу 18S-рРНК. Напомним, что у прокариот инициирующая последовательность в мРНК спаривается с 3'-концом 16S-рРНК (разд. 27.14). Роль очень длинной нетранслируемой последовательности, расположенной с 3'-стороны, неизвестна. Для этого участка длиной 637 нуклеотидов характерно обилие коротких повторяющихся последовательностей. Фрагменту *poly(A)* в овалбуминовой мРНК, как и в других мРНК, предшествует GC, а примерно за 20 нуклеотидов до этого - AAUAAA.

29.25. Эукариотическая рибосома (80S) состоит из малой (40S) и большой (60S) субчастиц

Аппарат синтеза белка у эукариот аналогичен соответствующему аппарату у прока-

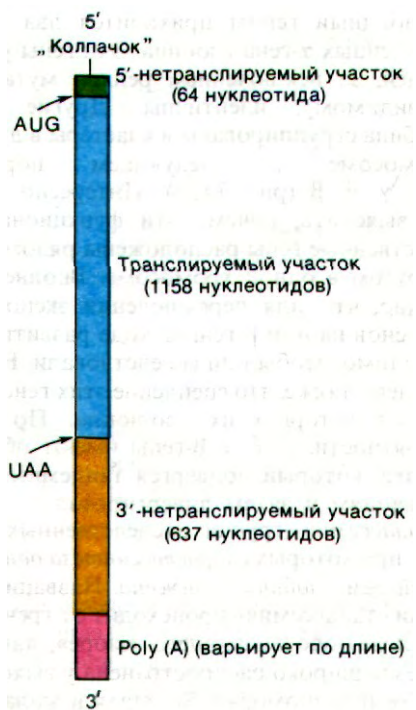


Рис. 29.34. Схема организации овалбуминовой мРНК курицы.



Рис. 29.35. Электронная микрофотография эукариотических 80S рибосом. (Печатается с любезного разрешения д-ра Miloslav Boublik.)

риот, но составляющие его белки и РНК отличаются от прокариотических и, кроме того, они содержатся в большем количестве. Цитоплазматические рибосомы эукариотических клеток несколько крупнее, чем рибосомы бактерий. Эукариотические рибосомы (рис. 29.35) имеют коэффициент седиментации 80S, а не 70S. Подобно бактериальным рибосомам, они диссоциируют на большую (60S) и малую (40S) субчастицы. 40S-субчастица содержит молекулу 18S-РНК и примерно 30 белков. Остальные три рибосомные РНК - 5S, 5.8S и 28S - локализованы в 60S-субчастице, в которую входит также примерно 45 белков.

Стадии трансляции - инициация, элонгация и терминация - в основном сходны у эукариот и прокариот. Однако в некоторых частностях механизмы реакции различаются. Так, эукариоты используют для инициации особую *тРНК* (она называется *тРНК^{Met}*), но она у них не формируется. Эукариоты и прокариоты различаются также по чувствительности к некоторым ингибиторам трансляции. Циклогексими́д ингибирует элонгацию только у эукариот, тогда как эритромицин блокирует эту же стадию только у прокариот. Любопытно отметить, что рибосомы митохондрий и хлоропластов имеют больше общего с бактериальными рибосомами, чем с рибосомами окружающего их цитозоля. Кроме того, в митохондриях и хлоропластах используется формирующая инициаторная *тРНК*, а их рибосомы чувствительны к большинству ингибиторов, избирательно блокирующих трансляцию у прокариот.

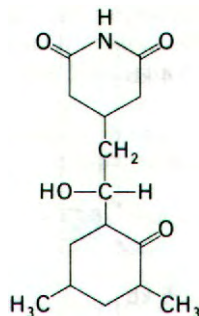


Рис. 29.36. Структура циклогексимида - ингибитора стадии элонгации синтеза белка у эукариот, но не у прокариот.

29.26. Талассемия - генетически обусловленное нарушение синтеза гемоглобина

Изучение гемоглобина внесло большой вклад в наши представления о структуре и функции белка (гл. 4 и 5). Точно так же исследования, посвященные генам гемоглобина и их выражению, оказались важным источником данных о функционировании эукариотических генов. В процессе внутриутробного развития происходит замена эмбриональных гемоглобинов гемоглобином плода (HbF , $\alpha_2\gamma_2$), а затем гемоглобином взрослого типа (HbA , $\alpha_2\beta_2$). Кроме того, во взрослом организме образуется небольшое количество гемоглобина HbA_2 , субъединичная структура которого $\alpha_2\delta_2$. Напомним, что HbF имеет более высокое сродство к кислороду, чем HbA , так как он менее прочно связывает бисфосфолипид (разд. 4.7). Это повышенное сродство к кислороду благоприятствует его переносу из кровеносной системы матери в кровеносную систему плода. В действительности HbF представляет собой смесь двух разновидностей, одна из которых содержит в положении 136 γ -цепи глицин, а другая - аланин. Эти разновидности обозначаются G_γ и A_γ соответственно.

Все гены гемоглобина картированы. На

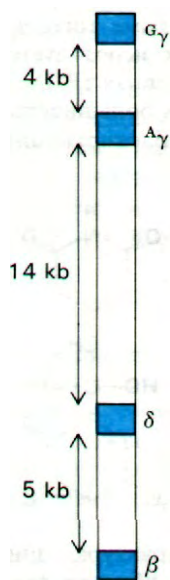


Рис. 29.37. Карта генов γ -, δ - и β -глобина человека.

гаплоидный геном приходится два тесно сцепленных α -гена глобина. Эти гены у всех людей, за исключением редких мутантов, по-видимому, идентичны. Другие гены глобина сгруппированы в кластеры в другой хромосоме в следующем порядке: G_γ - A_γ - δ - β (рис. 29.37). Интересно было бы выяснить, почему эти функционально родственные гены расположены рядом друг с другом в одной хромосоме. Вполне возможно, что для переключения экспрессии с γ -генов на δ - и β -гены в ходе развития необходимо, чтобы они соседствовали. Не исключено также, что сцепление этих генов отражает историю их эволюции. По всей вероятности, γ -, δ - и β -гены имеют общего предка, который подвергся тандемным дупликациям и затем дивергировал.

Талассемии - группа наследственных анемий, при которых *скорость синтеза одной из цепей гемоглобина понижена*. Название болезни «талассемия» происходит от греческого слова, обозначающего «море», так как болезнь широко распространена у выходцев из Средиземноморья. Большая и малая талассемии наблюдаются у гомозиготных и гетерозиготных больных соответственно. Буквенное обозначение α или β указывает, какая цепь синтезируется с пониженной скоростью. В настоящее время в результате изучения глобиновой мРНК и клонированной глобиновой ДНК начинает проясняться причина этих заболеваний. Установлены молекулярные механизмы некоторых видов талассемий.

1. **Делеция гена.** При некоторых видах α -талассемий делетированы один или оба α -глобиновых гена.

2. **Нестабильность мРНК.** В гемоглобине Constant Spring α -цепь содержит 172 остатка вместо 141 из-за мутации, приводящей к замене стоп-кодона UAA в кодон глутамин САА. Трансляция участка, который в норме не является кодирующим, каким-то образом делает мутантную мРНК чувствительной к действию нуклеаз.

3. **Нарушение инициации цепей.** При некоторых видах β -талассемии иницирование трансляции происходит слишком медленно, что, возможно, объясняется дефектом в 5'-нетранслируемой области.

4. **Преждевременная терминация цепи.** Один из видов β -талассемии возникает в результате замены одного основания в кодоне лизина ААГ, приводящей к образованию стоп-кодона UAG в 17-м положении.

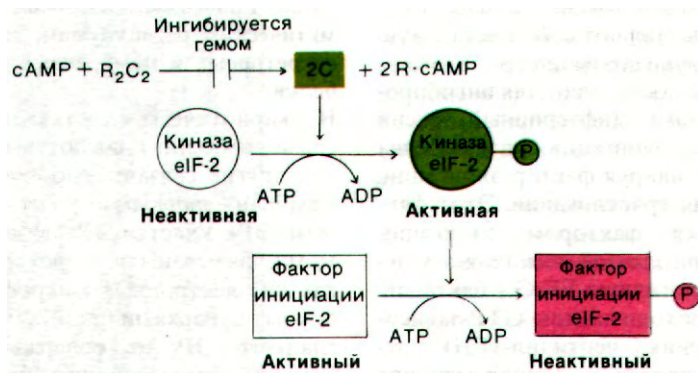


Рис. 29.38. Каскад фосфорилирования, инактивирующий фактор инициации eIF-2.

5. Пониженное образование мРНК. При многих видах β -талассемии, как оказалось, ген β -глобина имеется, но β -глобиновой мРНК образуется очень мало. В настоящее время причина этого явления интенсивно изучается. Не исключена возможность, что при некоторых видах β -талассемии не происходит правильного вырезания вставочных последовательностей¹.

29.27. Трансляция регулируется каскадом протеинкиназ, инактивирующим один из факторов инициации

В экстрактах ретикулоцитов происходит с высокой скоростью синтез субъединиц гемоглобина до тех пор, пока не иссякает гем. В отсутствие гема синтез белка останавливается из-за быстрого образования ферментативного ингибитора белкового синтеза. Этим ингибитором является протеинкиназа. Мишенью для киназы служит eIF-2 - фактор инициации, связывающий GTP и доставляющий Met-tРНК_i к 40S-субчастице рибосомы². Инактивация eIF-2 в результате фосфорилирования приводит к блокирова-

нию инициации синтеза белка. Каким же образом гем регулирует активность этой киназы? Действие это опосредуется еще одной киназой (рис. 29.38). Киназа eIF-2, модифицирующая фактор инициации, сама существует в двух формах - неактивной дефосфорилированной и активной фосфорилированной. Фосфорилирование киназы eIF-2 катализируется зависимой от циклического АМР киназой, состоящей из двух типов субъединиц - двух регуляторных (R) и двух каталитических (C). Неактивный комплекс R₂C диссоциирует под действием циклического АМР на две каталитически активные C-субъединицы и две R-субъединицы. Гем блокирует процесс диссоциации, и как следствие этого активации двух киназ регуляторной системы не происходит. В результате фактор eIF-2 не фосфорилируется и сохраняет свою активность в инициации белкового синтеза. Этот каскад протеинкиназ напоминает регуляцию метаболизма гликогена (разд. 16.15). Эти процессы имеют еще и то общее, что в обоих случаях регуляторное действие этих киназ обращается специфическими фосфатазами.

29.28. Дифтерийный токсин блокирует синтез белка у эукариот, ингибируя транслочкацию

До появления эффективной иммунизации дифтерия была основной причиной детской смертности. Летальное действие этой болезни обусловлено главным образом токсином *Corynebacterium diphtheriae* - бактерии, развивающейся в верхних дыхательных путях. Структурный ген токсина локализован в лизогенизирующем фаге, который содержат некоторые штаммы *C. diphtheriae*. Несколько

¹ В случае так называемой β^+ -талассемии это оказалось именно так, причем единственное отличие мутантного гена от гена дикого типа - замена одного-единственного нуклеотида в интроне. - Прим. перев.

² Каскадный механизм регуляции, описанный автором и предложенный в лаборатории Очоа, оказался ошибочным. Хотя cAMP-зависимая протеинкиназа фосфорилирует многие белки, она не затрагивает eIF-2 и никак не влияет на активность протеинкиназы в физиологических условиях. [Hunt T., Phil. Trans. R. Soc. Lond., B 302. 127-134 (1983).] - Прим. перев.

29. Хромосомы и выражение генов у эукариот

микрограммов этого токсина с массой 61 кДа обычно представляют собой летальную дозу для неиммунизированного человека, так как этой дозы достаточно для ингибирования синтеза белка. Дифтерийный токсин блокирует стадию элонгации синтеза белка у эукариот, инактивируя фактор элонгации, необходимый для транслокации. Этот фактор, называемый фактором элонгации 2 (EF-2) или *транслоказой*, выполняет у эукариот роль, аналогичную EF-G у бактерий. Транслоказа необходима для GTP-зависимого перемещения пептидил-тРНК из А-участка в Р-участок и одновременного перемещения информационной РНК сразу после образования пептидной связи. Особенно интересен механизм инактивации транслоказы дифтерийным токсином. Токсин катализирует ковалентную модификацию транслоказы. При этом NAD^+ служит донором остатка аденозиндифосфатрибозы



(ADPR); в результате реакции высвобождается никотинамид.

Молекула дифтерийного токсина состоит из двух частей. Ее можно расщепить на два фрагмента - с массой 21 кДа (фрагмент А) и 40 кДа (фрагмент В). Домен В связывается с поверхностью чувствительных клеток, а домен А катализирует ADP-рибозилирование транслоказы. Точнее, домен В связывается с ганглиозидом G_{M1} плазматической мембраны, что позволяет каталитическому домену проникнуть в клетку. При этом связанный токсин расщепляется, так что фрагмент В остается на поверхности клетки, а гидрофильный фрагмент А переносится в цитозоль. Интересно отметить, что многие другие токсины, например холерный токсин (разд. 35.7), также состоят из домена, предназначенного для связывания с поверхностью клетки, и каталитического домена, который инактивирует какой-либо важный компонент клетки.

29.29. Рибосомы, связанные с эндоплазматическим ретикулулом, синтезируют секреторные и мембранные белки

В эукариотических клетках некоторые рибосомы свободно плавают в цитозоле, тогда как другие связаны с обширной системой мембран - *эндоплазматическим ретикулулом* (ЭР). Участки ЭР, связанные с рибосомами, называются *шероховатым ЭР*, так как на электронных микрофотографиях он покрыт бугорками (рис. 29.39), в отличие от гладкого ЭР, не содержащего рибосом. Клетки, секретирующие большое количество белка, например ацинарные клетки поджелудочной железы, имеют сильно развитый шероховатый ЭР. В общем все известные секреторные белки синтезируются связанными с ЭР рибосомами. Кроме того, рибосомы, связанные с этой мембранной системой, синтезируют многие белки клеточной мембраны и таких органелл, как лизосомы.

Связанные с мембранами рибосомы в ооцитах ящериц, впавших в зимнюю спячку, образуют кристаллические слои (рис. 29.40). Эти упорядоченные слои изучаются в настоящее время методами реконструкции трехмерного изображения. На карте низкого разрешения видно, что и большая (60S), и малая (40S) субчастицы лежат вблизи поверхности мембраны. На большой субча-

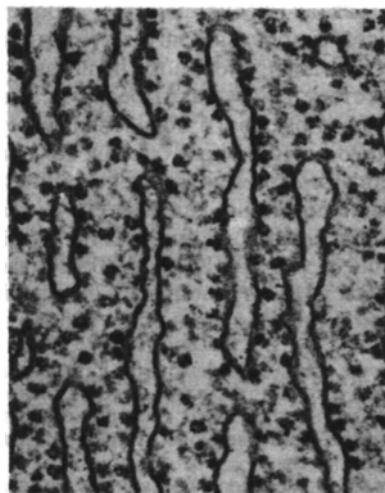


Рис. 29.39. Электронная микрофотография шероховатого эндоплазматического ретикулума. (Печатается с любезного разрешения д-ра George Palade.)

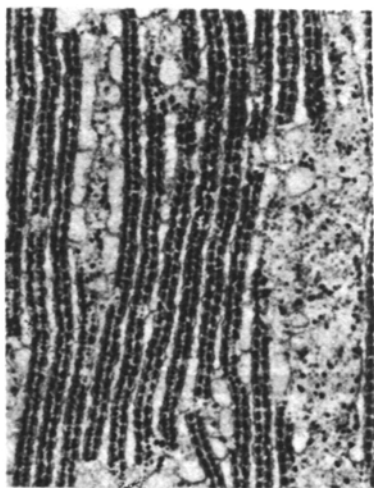


Рис. 29.40. Электронная микрофотография кристаллических слоев, связанных с мембранами рибосом в ооцитах ящериц, впавших в зимнюю спячку. (Печатается с любезного разрешения д-ра Nigel Unwin.)



Рис. 29.41. Связанная с мембраной рибосома. Это изображение низкого разрешения получено методом реконструкции на основе анализа ряда электронных микрофотографий упорядоченных рибосом, сделанных под различными углами. (По схеме, любезно предоставленной д-ром Nigel Unwin.)

стице имеется выступ, вдающийся в мембрану (рис. 29.41). Шероховатый ЭР (в отличие от гладкого ЭР) содержит два трансмембранных белка, называемых *рибофоринами*, которые специфически взаимодействуют с большой рибосомной субчастицей.

В связи с синтезом и дальнейшей судьбой белков, образованных на рибосомах ЭР, возникают три основных вопроса.

1. *Существует ли два класса рибосом - свободные рибосомы цитозоля и связанные с мембранами рибосомы - или все рибосомы по сути одинаковы?* Если существует только один класс рибосом, чем определяется, остается ли данная рибосома свободной или связывается с шероховатым ЭР?

2. *Каким образом новообразованная полипептидная цепь, выходящая из связанной с мембраной рибосомы, преодолевает барьер проницаемости шероховатого ЭР?* Например, такие секреторные белки, как проферменты поджелудочного сока (разд. 8.1), вскоре после синтеза обнаруживаются в полости ЭР.

3. *Чем определяется судьба белка, синтезированного на связанной с мембраной рибосоме?* Некоторые из этих белков экспортируются из клетки, тогда как другие предназначены для органелл внутри клетки. Кроме того, белки синтезированные шероховатым ЭР, обнаруживаются в качестве составной части плазматической и внутриклеточных мембран.

29.30. Сигнальные последовательности позволяют секреторным белкам проходить через мембрану эндоплазматического ретикула

Исследования белоксинтезирующей активности рибосом в бесклеточных системах дали ответ на первый вопрос. Выделяли свободные рибосомы из цитозоля и добавляли их к препарату мембран шероховатого ЭР, с которых были удалены рибосомы. Эта реконструирующая система в присутствии соответствующих мРНК и других растворимых факторов активно синтезировала секреторные белки. Точно так же рибосомы, полученные из препарата шероховатого ЭР, проявляли нормальную активность при синтезе белков, которые остаются в цитозоле. Кроме того, никаких структурных различий между свободными рибосомами и рибосо-

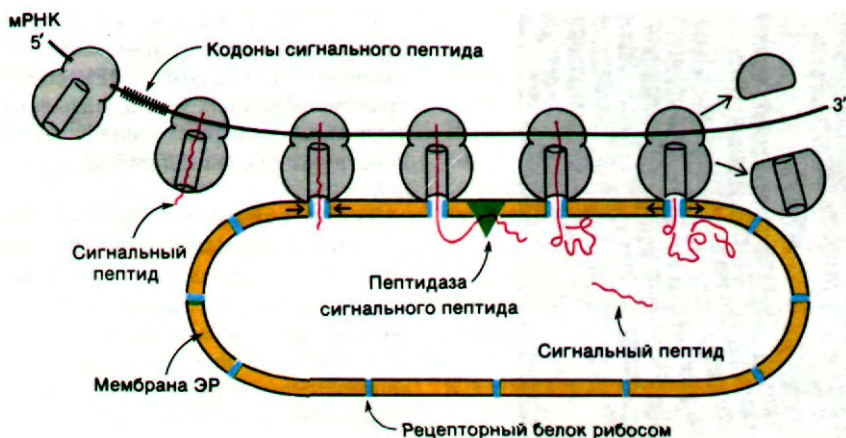


Рис. 29.42. Гипотеза сигнальной последовательности, образующейся при биосинтезе секреторных и мембранных белков. Согласно этой гипотезе, N-концевая последовательность новообразованной полипептидной цепи (показана красным) привязывает рибосому к мембране ЭР. Затем сигнальная последовательность удаляется пептидазой, расположенной на внутренней стороне ЭР. (Blobel G. In: International Cell Biology, Brinkley B. R., Porter K. R., eds., Rockefeller Univ. Press, N. Y., 1977, p. 318.)

мами, полученными из шероховатого ЭР, не обнаруживалось. Следовательно, связанные с мембранами рибосомы и свободные рибосомы, по сути, одинаковы. Остается ли данная рибосома свободной или прикрепляется к шероховатому ЭР, определяется только природой белка, который она синтезирует.

Какая же особенность синтезирующегося белка определяет, плавают ли ассоциированная с ним рибосома свободно в цитозоле или связывается с мембраной ЭР? В 1970 г. Дэвид Сабатини и Гюнтер Блобел (David Sabatini, Gunter Blobel) постулировали, что сигналом прикрепления служит последовательность аминокислотных остатков, прилегающая к N-концу новообразующейся полипептидной цепи. Вскоре эта гипотеза сигнальной последовательности (рис. 29.42) на-

шла подтверждение в работах Сезара Милстайна и Джорджа Браунли (Cesar Milstein, George Brownlee), показавших, что иммуноглобулиновая цепь, синтезированная *in vitro* свободными рибосомами, содержит N-концевую последовательность из 20 остатков, которой нет в зрелом белке, синтезированном *in vivo*. Затем Блобел обнаружил, что все основные секреторные белки поджелудочной железы, синтезированные *in vitro* на свободных рибосомах, содержат на N-конце дополнительные фрагменты длиной около двадцати аминокислот. В настоящее время сигнальные последовательности многих секреторных белков расшифрованы. Они имеют длину от 15 до 30 остатков и содержат много неполярных аминокислот (рис. 29.43).

Гидрофобные сигнальные последовательности, видимо, принимают конформации, которые узнаются белками мембраны ЭР, образующими каналы. По всей вероятно-

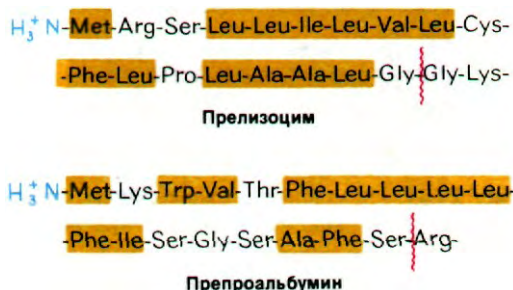


Рис. 29.43. Сигнальные последовательности двух секреторных белков. Гидрофобные остатки отмечены желтым. Место расщепления указано красной чертой.

Сокращения, принятые для обозначения сахаров:

Fuc - фукоза

Gal - галактоза

Glc - глюкоза

GlcNAc - N-ацетилглюкозамин

Man - манноза

NAN - N-ацетилнейраминида (сиаловая кислота)

сти, новообразующиеся полипептидные цепи активно протягиваются через канал в ЭР по мере синтеза. Затем особая пептидаза отщепляет сигнальные последовательности на внутренней стороне ЭР (см. рис. 29.42). Новообразующиеся цепи, которые должны стать составной частью мембраны, по-видимому, содержат специальные последовательности, блокирующие перенос полипептида через мембрану ЭР до тех пор, пока синтез не доходит до С-конца. В случае же секреторных белков, наоборот, через мембрану ЭР транспортируется вся полипептидная цепь.

Главная особенность механизма сигнальных последовательностей состоит в том, что перенос полипептида через мембрану ЭР сопряжен с трансляцией. Однако некоторые белки могут пересекать мембрану уже после того, как их синтез завершен. Например, белки митохондрий и хлоропластов в большинстве своем кодируются ядерными генами и синтезируются на свободных рибосомах. Эти белки выходят в цитозоль и затем проходят через мембрану органеллы. Очевидно, транспорт этих белков происходит *посттрансляционно*, а не во время трансляции. Интересно отметить, что эти митохондриальные и хлоропластные белки, подобно секреторным белкам, содержат N-концевые последовательности, которые удаляются вскоре после их проникновения через мембрану.

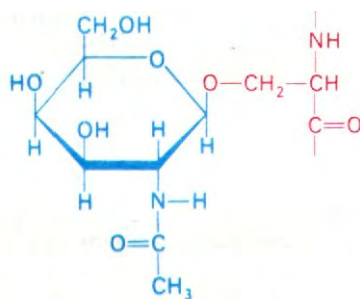
29.31. Присоединение сахарных остатков «ядра» к гликопротеинам происходит в эндоплазматическом ретикулуле

при участии донора долихола

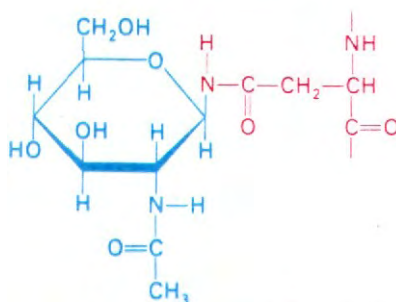
Почти ко всем белкам, синтезированным рибосомами, связанными с ЭР, присоединяются ковалентно связанные углеводные остатки. Растворимые белки, синтезируемые свободными рибосомами в цитозоле, наоборот, почти никогда не связаны с углеводами. Как уже упоминалось (разд. 10.12), остатки сахара, очевидно, ориентируют гликопротеины в мембранах. Кроме того, углеводные группы могут в какой-то

степени предопределять судьбу гликопротеина. Обычно гликопротеин содержит одну или несколько олигосахаридных групп, присоединенных к аспарагиновым боковым цепям N-гликозидными связями. Реже сахара прикрепляются к сериновым или треониновым боковым цепям O-гликозидными связями. Непосредственно с остатками аспарагина всегда связан N-ацетилглюкозамин, тогда как к серину и треонину присоединяется N-ацетилгалактозамин.

В гликопротеинах встречаются самые разнообразные олигосахариды (рис. 29.44). Однако в основе этого разнообразия лежит общий план строения: *углеводные остатки*,

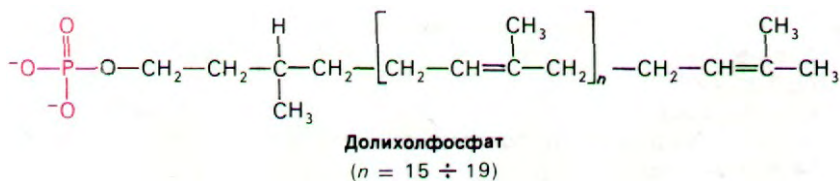


N-ацетилгалактозамин,
присоединенный
к остатку серина
O-гликозидной связью



N-ацетилглюкозамин,
присоединенный
к остатку аспарагина
N-гликозидной связью

29. Хромосомы и выражение генов у эукариот



присоединенные к остаткам аспарагина (через атом азота), имеют общее внутреннее олигосахаридное «ядро». Этот повторяющийся мотив отражает способ биосинтеза олигосахаридной части гликопротеинов: общий олигосахаридный блок (рис. 29.45) переносится с активирующего липидного переносчика на растущую полипептидную цепь на

внутренней стороне мембраны ЭР. Переносчиком служит долихолфосфат - липид с очень длинной цепью, содержащий около двадцати изопреновых (C_3) остатков. Концевая фосфатная группа этого весьма гидрофобного переносчика - место прикрепления активированного олигосахарида.

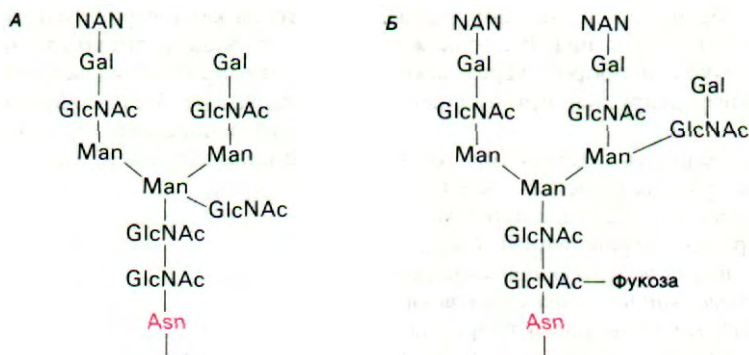


Рис. 29.44. Структура олигосахаридного остатка, связанного с аспарагином в человеческом иммуноглобулине (А) и в тиреоглобулине свиньи (Б).

К долихолфосфату присоединяется олигосахаридный блок, состоящий из двух остатков N-ацетилглюкозамина, девяти манноз и трех глюкоз. Его образование идет путем последовательного присоединения моносахаридов (рис. 29.46).

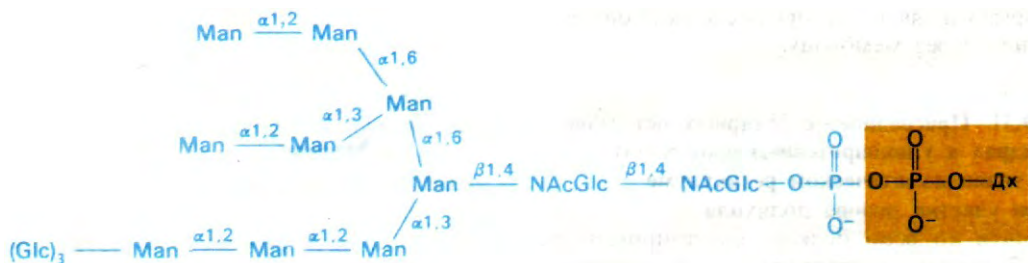


Рис. 29.45. Структура активированного олигосахаридного «ядра» (показано синим цветом). Переносчик (показан желтым цветом) - долихолфосфат (Дх).

Активированные доноры сахаров в этих реакциях - производные UDP, GDP и долихола. Ряд специфических трансфераз катализирует синтез активированного олигосахаридного «ядра». Затем оно переносится целиком на определенный остаток аспарагина растущей полипептидной цепи. Активированный олигосахарид и специфическая

трансферазы расположены на внутренней стороне ЭР. Об этом свидетельствует тот факт, что белки в цитозоле не гликозилированы. Олигосахарид может быть присоединен только к такому аспарагину, который входит в последовательность Asn-X-Ser или Asn-X-Thr. В большинстве случаев два из трех остатков глюкозы присоединенного олигосахарида быстро удаляются, когда гликопротеин еще связан с ЭР.

При переносе олигосахарида на белок высвобождается долихолпирофосфат, который под действием фосфатазы снова превращается в долихолфосфат. Это превращение блокируется антибиотиком *бацитрацином* (разд. 32.6). Еще один интересный антибиотик-ингибитор - *туникамидин*, гидрофобный аналог UDP-N-ацетилглюкозамина. Туникамидин блокирует первый этап образования олигосахаридного «ядра» - присоединение N-ацетилглюкозамина к долихолфосфату.

29.32. Модификация и сортировка гликопротеинов происходит в аппарате Гольджи

Белки, находящиеся во внутреннем пространстве ЭР и в его мембране, переносятся в *аппарат Гольджи* - стопку уплощенных мембранных мешков (рис. 29.47). В этой органелле олигосахаридное «ядро» гликопротеинов удаляется и к ним присоединяются новые сахара. Кроме того, аппарат Гольджи сортирует и упаковывает гликопротеины для транспортировки в другие участки клетки. Гликопротеины доставляются из ЭР к выпуклой поверхности аппарата Гольджи в пузырьках диаметром 500 А, окруженных оболочкой, покрытой чем-то вроде щетинок (рис. 29.48). Эта оболочка представляет собой многогранную решетчатую структуру, состоящую из субъединиц *клатрина* массой 180 кДа (рис. 29.49). Эти так называемые *окаймленные пузырьки* отпочковываются от ЭР и затем сливаются с аппаратом Гольджи. Кроме того, они переносят мембранные белки от вогнутой поверхности аппарата Гольджи в лизосомы, к плазматической мембране и в другие участки клетки. К тому же окаймленные пузырьки переносят белки и липиды от плазматической мембраны к внутренним мембранам. *Таким образом, клатрин играет ключевую роль в переносе фрагментов мембраны в пределах клетки.* Важно отметить, что во время этих процессов переноса асимметрия мембран сохраняется. Внутренняя поверхность мембраны

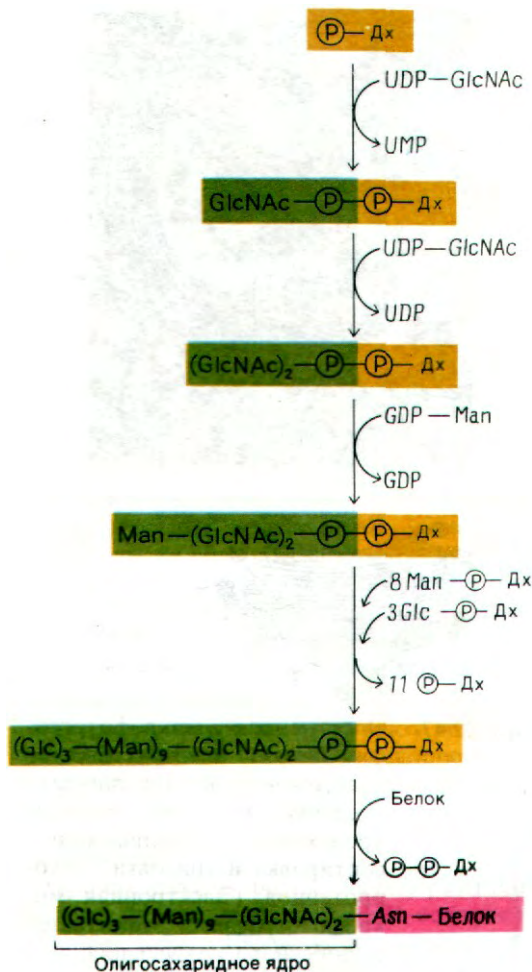


Рис. 29.46. Активированное олигосахаридное ядро синтезируется путем последовательного присоединения отдельных остатков сахаров. Затем весь блок переносится на боковую цепь определенного остатка аспарагина новообразованного белка во внутреннем пространстве ЭР.

окаймленного пузырька и аппарата Гольджи соответствует внутренней стороне мембраны ЭР. Когда окаймленные пузырьки сливаются с плазматической мембраной, их внутренняя поверхность становится наружной поверхностью плазматической мембраны. Следовательно, внутренние поверх-

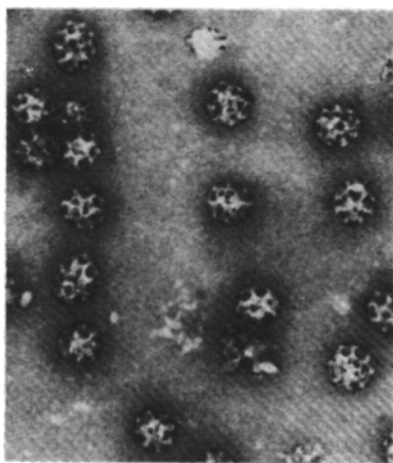
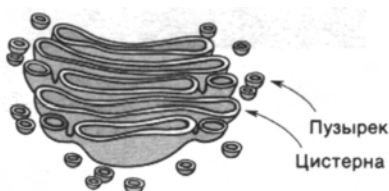
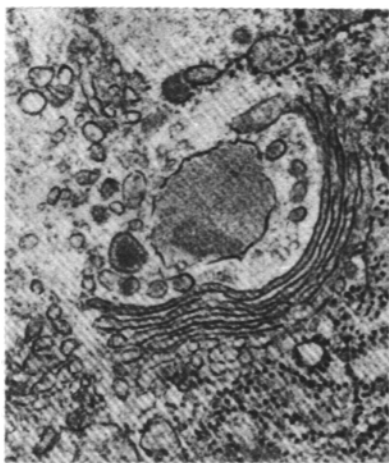


Рис. 29.47. Электронная микрофотография (*вверху*) и схематическое изображение (*внизу*) аппарата Гольджи. В этой органелле происходит модификация, сортировка и упаковка гликопротеинов. (Электронная микрофотография печатается с любезного разрешения д-ра Lynne Mercer.)

Рис. 29.48. Электронная микрофотография окаймленных пузырьков (*вверху*). Схема окаймленного пузырька. (Печатается с любезного разрешения д-ра Barbara Pearse.)

ности мембраны ЭР и других органелл соответствуют наружной поверхности плазматической мембраны (рис. 29.50). По этой причине углеводные группы гликопротеинов плазматической мембраны всегда расположены на ее наружной поверхности (разд. 10.12).

В аппарате Гольджи происходит перестройка олигосахаридных групп гликопротеинов. Единственная оставшаяся глюкоза и несколько оставшихся манноз олигосахаридного «ядра» удаляются. На этом формирование углеводных остатков некоторых гликопротеинов заканчивается. Более сложные олигосахариды других гликопротеинов образуются путем последовательного присоединения сахаров к остаткам

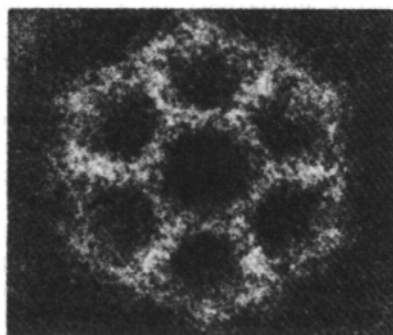


Рис. 29.49. Изображение реконструированного окаймленного пузырька. Оно получено наложением многих электронных микрофотографий. [Woodward M, P., Roth T. F., J. Supramol. Structure, 11, 240 (1979).]

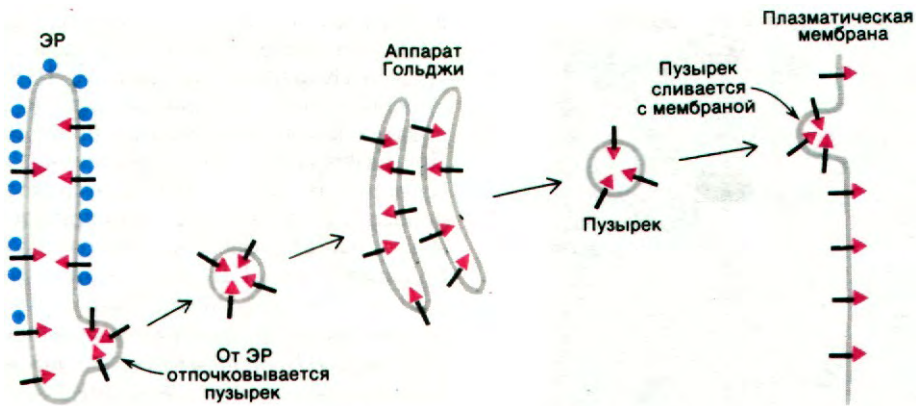


Рис. 29.50. Асимметрия клеточных мембран. Внутренние поверхности ЭР и других органелл соответствуют наружной поверхности плазматической мембраны.

«ядра». Например, в качестве активированных доноров при синтезе конечного трисахаридного остатка, обнаруженного в некоторых гликопротеинах, выступают UDP-N-ацетилглюкозамин, UDP-галактоза и CMP-нейраминидат (рис. 29.51). Этот последний этап биосинтеза, протекающий в аппарате Гольджи, получил название *окончательного гликозилирования* - в отличие от *гликозилирования олигосахаридного «ядра»*, которое происходит в ЭР.

Как происходит сортировка гликопротеинов в аппарате Гольджи? Каким путем они доставляются в места назначения? Ответа на эти интригующие вопросы пока нет, но ключом к пониманию проблемы может послужить *болезнь I-клеток* (ее также называют муколипидозом II). Это нарушение функции лизосом наследуется как аутомный рецессивный признак и характеризуется сильной задержкой психомоторного развития и деформацией скелета. Лизосомы в соединительных тканях больных содержат крупные включения (название болезни происходит от англ. inclusion - включение) непереваренных гликозаминогликанов и гликолипидов. *Наличие этих включений обусловлено отсутствием в лизосомах больных по меньшей мере восьми ферментов, необходимых для их расщепления.* В то же время огромные количества этих ферментов обнаруживаются в моче и крови больных. Следовательно, синтез активных ферментов при болезни I-клеток происходит, но вместо то-

го, чтобы запастись в лизосомах, они экспортируются из клетки. Другими словами, *при болезни I-клеток целый ряд ферментов локализуется в неправильном месте.* Эти ферменты не содержат маннозо-6-фосфата, который обычно с ними связан. Следовательно, *маннозо-6-фосфат, по всей вероятности, представляет собой маркер, направляющий в норме многие гидролитические ферменты из аппарата Гольджи в лизосомы.* Интересно выяснить, участвуют ли углеводные остатки других гликопротеинов в регуляции внутриклеточных передвижений.

Заключение

Эукариотическая хромосома содержит одну молекулу двухспиральной ДНК, которая по крайней мере в 100 раз длиннее, чем молекулы ДНК в клетках прокариот. ДНК прочно связана с основными белками, которые называются гистонами. Хроматиновая нить представляет собой гибкую цепь нуклеосом. «Ядро» этого повторяющегося элемента (минимальная нуклеосома, кор) содержит фрагмент ДНК длиной 140 пар оснований, накрученный на октамер гистонов, в состав которого входят по две молекулы гистонов H2A, H2B, H3 и H4. Минимальные нуклеосомы соединены между собой линкерной ДНК, длина которой обычно составляет 60 пар оснований, связанной с одной молекулой гистона H1. Благодаря нуклеосомам ДНК может укорачиваться в семь раз. Это - первый уровень конденсации ДНК. Эукариотическая ДНК реплицируется полуконсервативным путем и наполовину непрерывно (т.е. получает по одной из родительских цепей), причем репликация на-

29. Хромосомы и выражение генов у эукариот

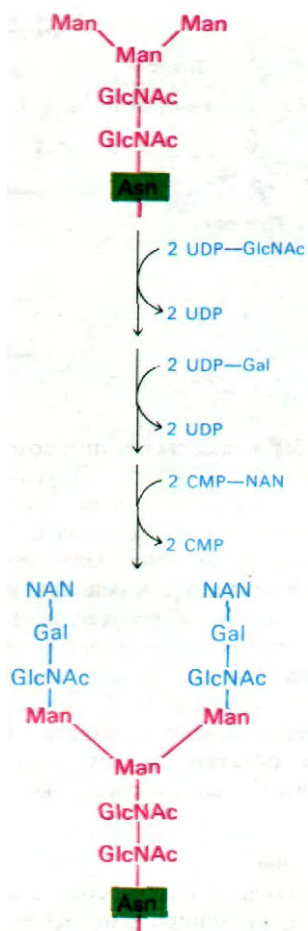


Рис. 29.51. Завершающая стадия синтеза содержащего нейраминидат углеводного остатка гликопротеина (трансферрина человека). Эта реакция происходит в аппарате Гольджи.

чинается в нескольких тысячах мест. Большое число точек инициации обусловлено огромной длиной эукариотической ДНК по сравнению с прокариотической.

Кинетика реассоциации денатурированной нагреванием ДНК показывает, что эукариотическая ДНК в отличие от прокариотической содержит много повторяющихся последовательностей оснований. ДНК

с большим числом повторов (сателлитная ДНК) обычно расположена вблизи от центромера. Некоторые сателлитные ДНК представляют собой гептануклеотидную последовательность, повторенную более 10^4 раз. Другая фракция ДНК с умеренным числом повторов. В геноме многих эукариот гены рибосомных РНК и гистонов присутствуют в количестве десятков или сотен копий. Большая часть ДНК с умеренным числом повторов играет, по-видимому, какую-то регуляторную роль. Третья фракция - *уникальная ДНК*. Она состоит из последовательностей, которые встречаются в гаплоидном геноме только один или несколько раз. Многие из таких белков, как фиброин шелка, гемоглобин и овальбумин, кодируются уникальными генами. Эти гены дают большие количества стабильной мРНК. Уникальные последовательности обычно перемежаются с умеренно повторяющимися последовательностями. Кроме того, для высших эукариот характерно наличие вставочных последовательностей во многих генах, кодирующих белки.

РНК в эукариотических клетках синтезируется тремя типами РНК-полимераз. Первичные транскрипты претерпевают существенные изменения, прежде чем они перейдут из ядра в цитозоль в виде зрелых молекул рРНК, тРНК и мРНК. Информационные РНК получают из гораздо более длинных первичных транскриптов (гяРНК) путем расщепления и воссоединения фрагментов. Эукариотическая информационная РНК имеет на 5'-конце «колпачок» и на 3'-конце обычно длинную poly(A)-последовательность. Единственный транслируемый участок мРНК обрамлен некодирующими последовательностями, иногда очень длинными. Набор мРНК в эукариотической клетке зависит от избирательного процессинга первичных транскриптов, а также от скорости транскрипции различных генов. Регуляция на уровне трансляции, по-видимому, играет менее важную роль при детерминировании набора белков, синтезируемых каждой данной клеткой. 80S-рибосома эукариот состоит из 60S- и 40S-субчастиц. Как и у прокариот, у эукариот имеется особая инициаторная тРНК, но она не формилирована. Инициация у эукариот регулируется каскадом протеинкиназ, инактивирующих один из факторов инициации (eIF-2). Митохондрии и хлоропласты содержат собственную ДНК, которая не связана с гистонами. Синтез белка в этих органел-

лах напоминает синтез белка у бактерий.

Секреторные и мембранные белки синтезируются рибосомами, связанными с эндоплазматическим ретикуломом. Многие из этих белков содержат сильно гидрофобную N-концевую последовательность, которая служит сигналом для прикрепления рибосомы к мембране ЭР. Затем синтезирующаяся полипептидная цепь активно протягивается через мембрану ЭР, а сигнальная последовательность отщепляется на внутренней стороне. Почти ко всем белкам, синтезированным на связанных с мембранами полисомах, ковалентно присоединяется один или несколько углеводных остатков. В ЭР происходит перенос универсального олигосахаридного блока с активированного донора долихола на специфическую аспарагиновую боковую цепь. Гликопротеины переносятся из ЭР в аппарат Гольджи в окаймленных пузырьках. Эти пузырьки, покрытые клатрином, участвуют во многих процессах обмена между мембранными структурами. В аппарате Гольджи происходит укорачивание и окончательное гликозилирование олигосахаридных остатков. Кроме того, здесь гликопротеины сортируются и отправляются по назначению. Углеводные остатки, по-видимому, играют важную роль в этом процессе сортировки.

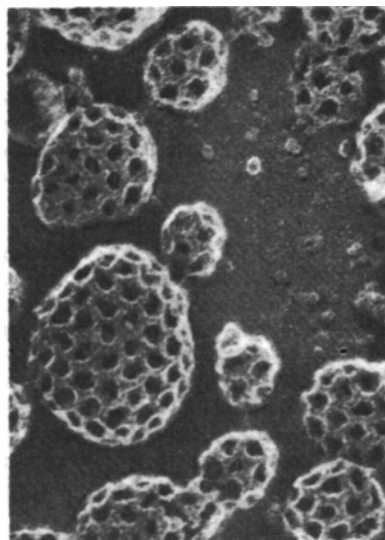


Рис. 29.52. Электронная микрофотография окаймленных пузырьков, лежащих на плазматической мембране клетки. (Печатается с любезного разрешения д-ра John Heuser.)

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Crick F., 1979. Split genes and RNA splicing, *Science*, 204, 264-271.

DeRobertis E.M., Gurdon J.B., 1979. Gene transplantation and the analysis of development, *Sci. Amer.*, 241(6), 74-82.

Beerman W., Clever U., 1974. Chromosomal puffs, *Sci. Amer.*, 210(4), 50-58.

Palade G., 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*, 189, 347-358. (Доступная и весьма информативная Нобелевская лекция.)

Rothman J.E., Lodish H.F., 1979. The assembly of cell membranes, *Sci. Amer.*, 240(1), 48-63. (Превосходное обсуждение проблемы асимметрии мембран.)

Хроматин

Cold Spring harbor Symposia, 1978. Chromatin, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, vol. 42.

McGhee J.D., Felsenfeld G., 1980. Nucleosome structure, *Ann. Rev. Biochem.*, 49, 1115-1155.

Kornberg R.D., 1977. Structure of chromatin, *Ann. Rev. Biochem.*, 46, 931-954.

Kornberg R.D., 1974. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA, *Science*, 184, 868-871.

Sperling R., Wachtel E.J. The histones, *Advan. Protein Chem.*, in press.

Репликация ДНК

Kornberg A., 1980. DNA Replication, Freeman. (В гл. 6 идет речь об эукариотической ДНК-полимеразе и о репликации у эукариот.)

DePamphilis M.L., Wassarman P.M., 1980. Replication of eucaryotic chromosomes: a close-up of the replication fork, *Ann. Rev. Biochem.*, 49, 627-666.

Kriegstein H.J., Hogness D.S., 1974. The mechanism of DNA replication in

Drosophila chromosomes: structure of replication forks and evidence for bidirectionality, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 71, 135-139.

Организация генома

Britten R., Kohn D., 1968. Repeated segments of DNA, *Sci. Amer.*, 222(4), 24-31.

Davidson E.H., Britten R.J., 1979. Regulation of gene expression: possible role of repetitive sequences, *Science*, 204, 1052-1059.

Long E.O., Dawid I.B., 1980. Repeated genes in eucaryotes, *Ann. Rev. Biochem.*, 49, 727-766.

Schimke R.T., Kaufman R.J., Alt F.W., Kellems R.F., 1978. Gene amplification and drug resistance in cultured murine cells, *Science*, 202, 1051-1055.

Kedes L.H., 1979. Histone genes and histone messengers, *Ann. Rev. Biochem.*, 48, 837-870.

Tzagoloff A., Macino G., Sebald W., 1979. Mitochondrial genes and

translation products, *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 419-441.

Разорванные гены, транскрипция и процессинг РНК

Darnell J.E., Jr., 1979. Transcription units for mRNA production in eukaryotic cells and their DNA viruses, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **22**, 327-353.

Abelson J., 1979. RNA processing and the intervening sequence problem, *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 1035-1069.

Royal A., Garapin A., Cami B., Perrin F., Mandel J.L., LeMeur M., Bregegegre F., Gannon F., LePenec J.P., Chambon P., Kourilsky P., 1979. The ovalbumin gene region: common features in the organisation of three genes expressed in chicken oviduct under hormonal control, *Nature*, **279**, 438-445.

DeRobertis E.M., Olson M.V., 1979. Transcription and processing of cloned yeast tyrosine tRNA genes microinjected into frog oocytes, *Nature*, **278**, 137-143.

Shatkin A.J., 1976. Capping of eucaryotic mRNAs, *Cell*, **9**, 645-653.

Трансляция

Wool I.G., 1979. Structure and function of eukaryotic ribosomes, *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 719-754.

Revel M., Groner Y., 1978. Post-transcriptional and translational controls of gene expression in eukaryotes, *Ann. Rev. Biochem.*, **47**, 1079-1126.

Parrenheimer A.M., Jr., 1977. Diphtheria toxin, *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 69-94.

Гены гемоглобина и талассемия

Weatherall D.J., Clegg J.B., 1979. Recent developments in the molecular genetics of human hemoglobin, *Cell*, **12**, 467-479.

Leder A., Miller H.I., Hamer D.H., Seidman J.G., Norman B., Sullivan M., Leder P., 1978. Comparison of cloned mouse α - and β -globin genes: conservation of intervening sequence locations and extragenic homology, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **75**, 6187-6191.

Weatherall D.J., 1978. The thalassemias. In: Stanbury J.B., Wyngaarden J.B. and Fredrickson D.S. (eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (4th ed.), pp. 1508-1523, McGraw-Hill

Синтез мембранных белков и секретруемые белки

Blobel G., Walter P., Chang G.N., Goldman B.M., Erickson A.H., Lingappa V.R., 1979. Translocation of proteins across membranes; the signal

hypothesis and beyond, *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **33**, 9-36.

Unwin P. N. T., 1977. Three-dimensional model of membrane-bound ribosomes obtained by electron microscopy, *Nature*, **269**, 118-122.

Rothman J.E., Lodish H.F., 1977. Synchronised transmembrane insertion and glycosylation of a nascent membrane protein. *Nature* **269**, 775-780.

Waechter C.J., Lennartz W.J., 1976. The role of polyprenol-linked sugars in glycoprotein synthesis, *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 95-112.

Kornfeld R., Kornfeld S., 1976. Comparative aspects of glycoprotein structure, *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 217-237.

Robbins P.W., Hubbard S.C., Turco S.J., Winh D.F., 1977. Proposal for a common oligosaccharide intermediate in the synthesis of membrane glycoproteins, *Cell*, **12**, 893-900.

Pearse B.M.F., 1980. Coated vesicles, *Trends Biochem. Sci.*, **5**, 131-134, (Краткий обзор о структуре и функции клатрина.)

Rothman J.E., Fine R.E., 1980. Coated vesicles transport newly synthesized membrane glycoproteins from endoplasmic reticulum to plasma membrane in two successive stages, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **77**, 780-784

ГЛАВА 30

Вирусы

Вирусы представляют собой инфекционные нуклеиновые кислоты, упакованные в защитную оболочку. Это - наиболее эффективные из внутриклеточных паразитов. В отличие от клеток вирусы не способны вырабатывать энергию с помощью метаболических реакций или синтезировать белки. Они отличаются от клеток и тем, что содержат только ДНК или только РНК, но никогда не содержат и то и другое одновременно. Одни вирусы содержат одноцепочечную нуклеиновую кислоту, другие - двухцепочечную. По сложности строения вирусы широко варьируют - от фага Q β - РНК-содержащего фага, имеющего всего 4 гена, - до вируса оспы, геном которого насчитывает примерно 250 генов. Готовый внеклеточный продукт размножения вируса называется *вирионом* (или *вирусной частицей*). Нуклеиновая кислота, входящая в состав вириона, одета белковым *капсидом*, защищающим ее от ферментативного расщепления и механических повреждений. Именно капсид обеспечивает внедрение нуклеиновой кислоты в клетки чувствительной клетки-хозяина. У некоторых более сложно устроенных вирусов животных капсид окружен *оболочкой*, содержащей липид и гликопротеин.

Мы уже видели, что изучение вирусов оказало глубокое воздействие на развитие молекулярной биологии. В качестве примера можно привести открытие информационной РНК. Неослабевающий интерес исследователей к вирусам объясняется несколькими причинами. Во-первых, размножение вируса - модель *развития клетки*, так как оно сопровождается последовательным выражением генов и сборкой макромолекул в весьма упорядоченные структуры. Относительно небольшое число вирусных генов, высокая скорость репликации и легкость генетического анализа также делают вирусы

весьма привлекательной моделью. Во-вторых, вирусы - источник представлений об *эволюционных процессах* и молекулярных аспектах *взаимоотношений хозяин-паразит*. В третьих, *некоторые вирусы вызывают у экспериментальных животных рак*. Интенсивно изучается и возможная роль вирусов в раковых заболеваниях человека.

30.1 Оболочка мелких вирусов состоит из множества идентичных белковых субъединиц
Общее число аминокислот в оболочке вируса всегда превосходит число нуклеотидов в его геноме. Например, белковая оболочка

Таблица 30.1. **Типы вирусов** (Davis B.D., Eisen H.N., Ginsberg H.S., Wood W.B., Jr., Microbiology, Harper and Row., 1973)

Нуклеиновая кислота	Представитель	При- мерное число генов
Одноцепочечная днк	Фаг ϕ X174	5
Двухцепочечная днк	Вирус полиомы	6
	Аденовирус 2	30
	Фаг T4	150
	Вирус коровьей оспы	240
Одноцепочечная РНК	Фаг Q β	3
	Вирус саркомы Рауса	4
	Вирус табачной мозаики	6
	Вирус полиомиелита	8
	Вирус гриппа	12
Двухцепочечная РНК	Реовирус	22

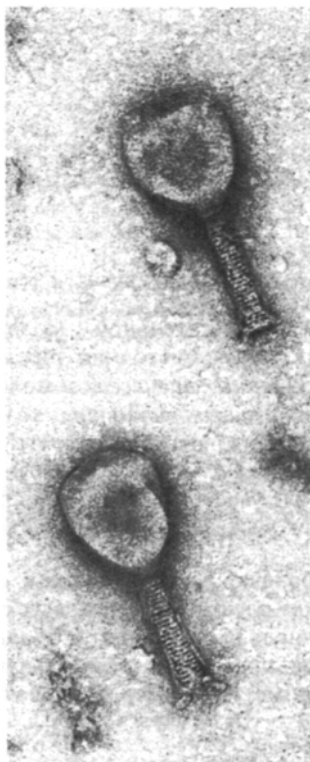


Рис. 30.1. Электронная микрофотография вирионов Т4 в зараженных клетках. (Печатается с любезного разрешения д-ра Jonathan King, д-ра Yoshiko Kikuchi и д-ра Elaine Lenk.)

одной частицы вируса табачной мозаики (ВТМ; рис. 30.2) содержит около 340000 аминокислотных остатков, а его РНК - всего 6400 нуклеотидов. В 1957 г. Френсис Крик и Джеймс Уотсон (Francis Crick, James Watson) обратили внимание на то, что белковая оболочка вируса не может состоять из одной большой молекулы или набора множества различных мелких белков, так как количество вирусной нуклеиновой кислоты слишком мало, чтобы кодировать такое огромное число аминокислотных остатков. С другой стороны, белковую оболочку нельзя уменьшить в размере, так как она должна закрывать всю нуклеиновую кислоту. Вирусы решают эту задачу генетической бедности, образуя оболочку из большого числа белковых субъединиц одного или нескольких

видов. Например, оболочка ВТМ состоит из 2130 идентичных субъединиц (каждая длиной 158 остатков).

Число способов построения вирусной оболочки из идентичных субъединиц весьма ограничено. Стабильность достигается путем образования максимального числа связей и использования одинаковых контактов между субъединицами. Образующаяся структура должна быть симметричной. Наиболее вероятны два способа укладки белковой оболочки: *цилиндрическая оболочка, обладающая спиральной симметрией, и сферическая оболочка, обладающая икосаэдрической симметрией* (рис. 30.3). По существу, все мелкие вирусы представляют собой *наполки или сферические частицы* (или сочетание этих двух форм). Правила, определяющие структуру сферических вирусов, сформулировали Дональд Каспар и Арон Круг (Donald Caspar, Aaron Klug). Толчком для вдохновения им послужили архитектурные проекты Бакминстера Фуллера (Buckminster Fuller).

30.2. Самосборка вируса табачной мозаики (ВТМ)

Самый простой и лучше всего изученный процесс сборки вируса - сборка ВТМ. Этот

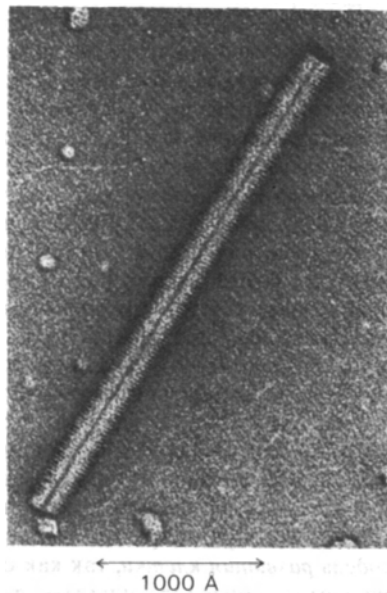


Рис. 30.2. Электронная микрофотография частицы вируса табачной мозаики (ВТМ). (Печатается с любезного разрешения д-ра Robley Williams.)

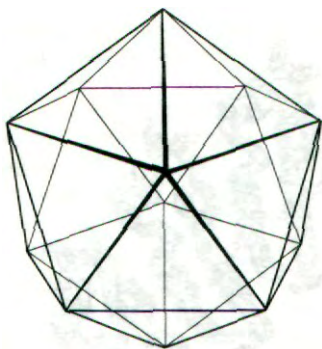


Рис. 30.3. Модель икосаэдра.

палочковидный вирус имеет длину 3000 А, диаметр 180 А (рис. 30.4) и массу примерно 40000 кДа. 2130 идентичных субъединиц белка оболочки плотно упакованы в спираль вокруг одноцепочечной РНК, содержащей 6390 нуклеотидов. РНК глубоко погружена в белок, что делает ее неуязвимой для рибонуклеаз. Каждая белковая субъединица взаимодействует с тремя нуклеотидами. Отделившись от белкового капсида, РНК весьма лабильна, тогда как интактный ВТМ сохраняет инфекционность десятилетиями.

Субъединицы ВТМ не связаны между собой ковалентно. Можно вызвать диссоциацию ВТМ на белок и РНК с помощью, например, концентрированной уксусной кислоты. В 1955 г. Хайнц Френкель-Конрат и Робли Уильямс (Heinz Fraenkel-Conrat, Robley Williams) показали, что в соответствующих условиях диссоциированные субъединицы оболочки и РНК ВТМ спонтанно реассоциируют и образуют вирусные частицы, неотличимые от исходного ВТМ по структуре и инфекционности. Это был первый пример самосборки активной биологической структуры. Процесс самосборки - это такой процесс, при котором в подходящих условиях среды происходит спонтанная ассоциация компонентов и образуется специфическая структура.

30.3. При сборке вирусной частицы ВТМ белковые диски присоединяются к пегле РНК

A priori простейший механизм сборки ВТМ заключался бы в ступенчатом присоединении отдельных белковых субъединиц к РНК. Трудность, однако, состоит в этом случае в том, что скорость нуклеации будет чрезвычайно мала. Прежде чем комплекс замкнется сам на себя, образовав один оборот

спирали, и таким образом стабилизируется, к гибкой молекуле РНК должно присоединиться примерно 17 субъединиц оболочки. Эта проблема может быть решена присоединением к РНК сразу целого комплекса из многих субъединиц. Действительно, белок оболочки легко образует *двухслойный диск* из 34 субъединиц. Каждый слой диска представляет собой кольцо из 17 субъединиц; примерно столько субъединиц ($16\frac{1}{3}$) приходится на один оборот спирали ВТМ. Круг и его сотрудники исследовали трехмерную структуру диска (рис. 30.5) и показали, что он представляет собой главный промежуточный продукт при сборке ВТМ. *Важнейшее свойство диска состоит в том, что его субъединицы скользят относительно друг друга и образуют спираль их двух оборотов, так называемую «запорную шайбу»* (рис. 30.6).

Диск гораздо быстрее взаимодействует с РНК ВТМ, чем с чужеродной ДНК. Следовательно, РНК ВТМ, по-видимому, содержит последовательность оснований, которую специфически узнает диск и которая

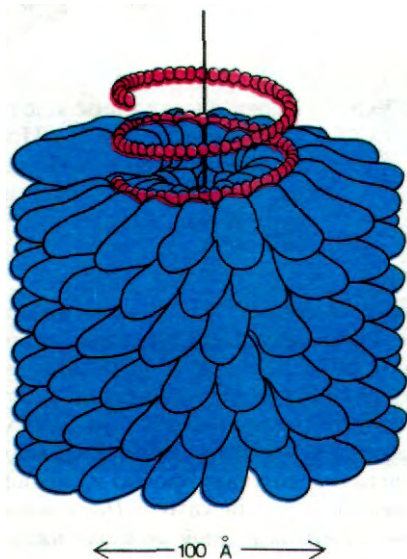


Рис. 30.4. Модель части ВТМ, на которой показана спиральная укладка белковых субъединиц вокруг одноцепочечной молекулы РНК. [Klug A., Caspar D. L. D., Advan. Virus Res., 7, 274 (1960).]

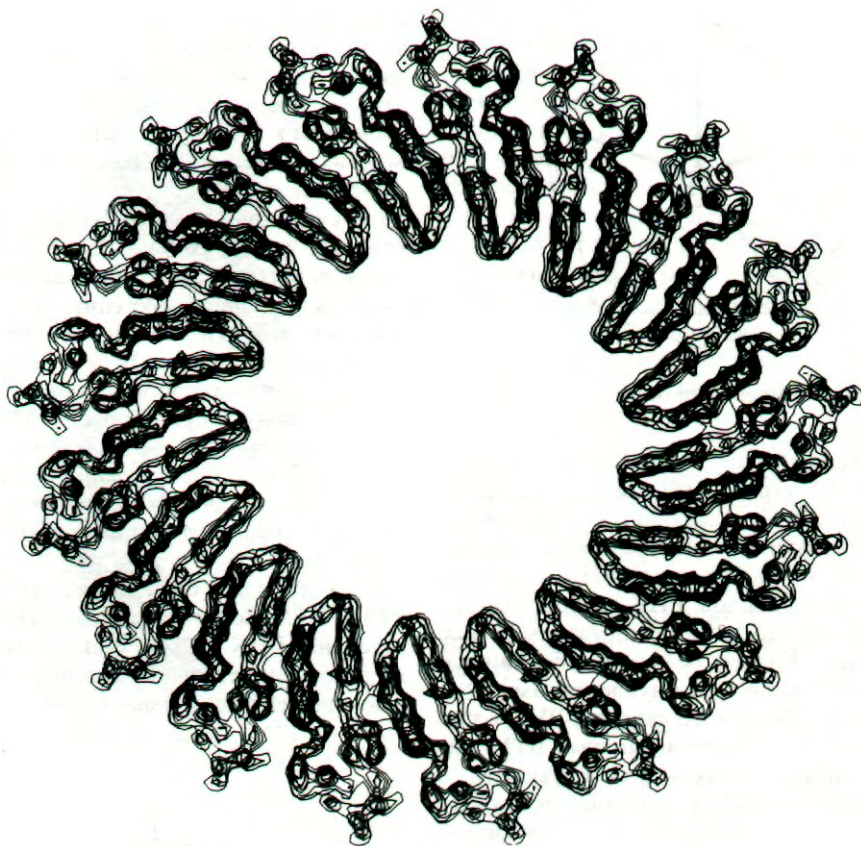


Рис. 30.5. Карта электронной плотности белкового диска ВТМ. Показан слой толщиной 6 А. (Печатается с любезного разрешения д-ра Aaron Klug.)

инициирует сборку. Эта область инициации была выделена следующим образом. К РНК ВТМ добавляли несколько дисков, чтобы покрыть область инициации, и затем расщепляли остальную РНК нуклеазой. Защищенный фрагмент содержит примерно 65 нуклеотидов, которые прочно и специфично связываются с дисками. *Последовательность оснований в этой области инициации дает все основания думать, что этот фрагмент РНК образует структуру шпильки со стеблем, состоящим из спаренных оснований, и петлей* (рис. 30.7). Самое интересное, что петля содержит в каждом третьем положении G. Такое расположение оснований в триплетях соответствует стехиометрии

субъединиц оболочки вируса - одна субъединица на три нуклеотида. Следовательно, по всей вероятности, петля связывается с первым диском, и с этого начинается сборка вирусной частицы.

Неожиданно оказалось, что петля инициации расположена далеко от обоих концов РНК. Точка начала сборки расположена на расстоянии 5300 нуклеотидов от 5'-конца и примерно 1000 нуклеотидов от 3'-конца РНК. Другой неожиданностью было то, что оба конца РНК выходят с *одной и той же* стороны растущей частицы ВТМ (рис. 30.8). Длина 3'-конца на протяжении процесса сборки остается более или менее постоян-

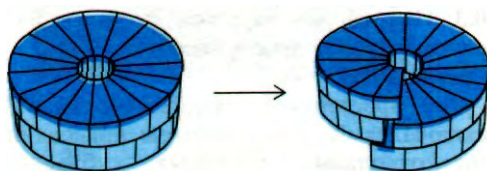


Рис. 30.6. Схема превращения белкового диска ВТМ в спиральную форму «запорной шайбы». [Klug A., Fed. Proc., 31, 40 (1972).]

ной, а 5'-конец по мере удлинения вирусной частицы становится короче.

Наиболее вероятная модель образования частиц проиллюстрирована на рис. 30.9. Сборка начинается с проникновения петли инициации в центральное отверстие двухслойного белкового диска. Петля связывается с первым оборотом диска, и прилегающий стебель, состоящий из спаренных оснований, раскрывается. Это взаимодействие переводит диск в форму спиральной запорной шайбы, и диск захватывает РНК. Так начинается построение спирали вируса. Затем к новообразованной петле РНК, торчащей из центрального отверстия, присоединяется еще один диск. Благодаря протаскиванию 5'-конца через центральное отверстие растущей вирусной частицы при добавлении каждого следующего диска образуется новая петля. Наконец, происходит одевание 3'-конца каким-то пока непонятным способом.

Помимо того что двухслойный диск обеспечивает быструю нуклеацию, он существенно увеличивает специфичность образования оболочки. Диск может связываться со многими нуклеотидами, тогда как одна субъединица - только с тремя. Следовательно, диск обладает гораздо более высокой избирательностью по отношению к РНК ВТМ по сравнению с мРНК клетки-хозяина, чем одна субъединица. Еще одно важное свойство дисков состоит в том, что в физиологических условиях они не образуют спиралей без РНК. В этом отношении важнейшую роль играют две карбоксильные группы в каждой субъединице. При нейтральном значении рН в спиральной форме ионизированы обе карбоксильные группы, а в диске - только одна. Электростатическое отталкивание между близко расположенными карбоксилат-ионами в спиральной форме благоприятствует образованию диска. Связывание РНК со спиральной формой сопровождается достаточным изменением свободной энергии, чтобы преодолеть электростатическое отталкивание карбоксилатных ионов. Итак, карбоксилат-ионы - негативный регулятор, препятствующий образованию спирали без РНК.

30.4. Заражение фагом Т4 полностью перестраивает синтез макромолекул в клетке *E.coli*

Бактериофаг Т4 - гораздо более сложный вирус, чем ВТМ. Его двухспиральная ДНК содержит примерно 165 генов по сравнению

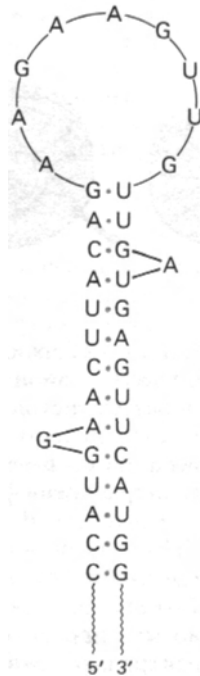


Рис. 30.7. Участок РНК ВТМ, обеспечивающий инициирование сборки вирусной частицы ВТМ.

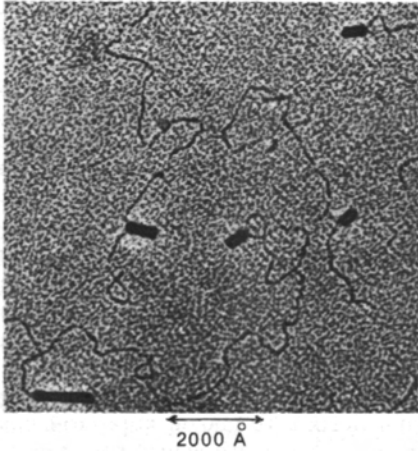


Рис. 30.8. Электронная микрофотография частично реконструированных частиц ВТМ. Видны два хвоста РНК, отходящие от каждого растущего вириона. [Lebeurier G., Nicholaeff A., Richards K. E., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 150 (1977).]

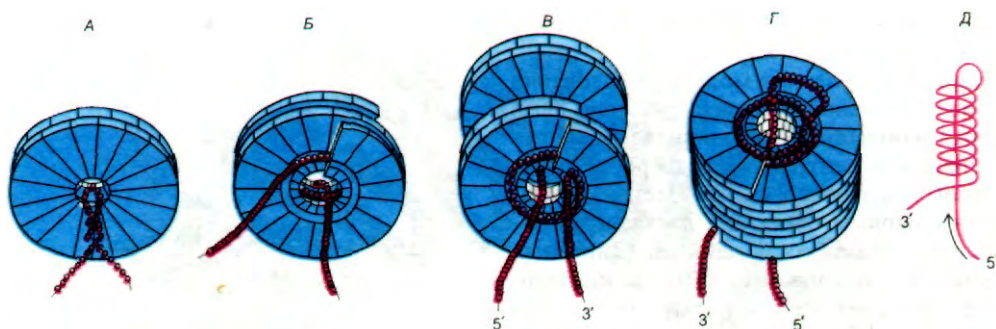


Рис. 30.9. Схема сборки ВТМ. А - область инициации в РНК образует петлю и проходит в центральное отверстие белкового диска. Б - диск переходит в спиральную форму «запорной шайбы». В - к тому концу РНК, где расположена петля, присоединяются новые диски. Г - одна из концов РНК все время протаскивается через центральное отверстие и взаимодействует с новыми дисками. Д - схематическое изображение молекулы РНК в частично собранном вирусе. Направление движения РНК, обозначено стрелкой. (Butler P. J.G., Klug A., Sci.Amer., 1978.)

чехол подтягивает головку фага к базальной пластинке и нитям отростка, и в результате центральный стержень проникает через клеточную стенку, но не через мембрану клетки. Затем обнаженная фаговая ДНК проникает через клеточную мембрану. По истечении нескольких минут все реакции синтеза клеточных ДНК, РНК и белка останавливаются и начинается синтез вирусных макромолекул. Другими словами, заразивший клетку вирус овладевает синтетическими механизмами бактериальной клетки и замещает ее гены своими.

В ДНК фага Т4 имеется три группы генов, которые транскрибируются на различных стадиях заражения: *предранние, ранние и по-*

с 6 генами ВТМ. Однако структура, размножение и процесс сборки фага Т4 изучены довольно хорошо, так как он подвергался интенсивному генетическому и биохимическому анализу. Вирион Т4 состоит из *головки, отростка* и шести *нитей (фибрилл) отростка* (рис. 30.10). Его молекула ДНК плотно упакована внутри икосаэдрической белковой оболочки и образует головку вируса. Отросток состоит из двух соосных трубок, соединенных с головкой короткой шейкой. В отростке сократительный чехол окружает центральный стержень, через который ДНК вводится в бактерию-хозяина. Отросток несет на конце базальную пластинку с шестью короткими зубцами, от которой отходит шесть длинных тонких нитей.

Концы нитей отростка связываются с определенными участками на клетке *E.coli*. В результате АТФ-зависимого сокращения

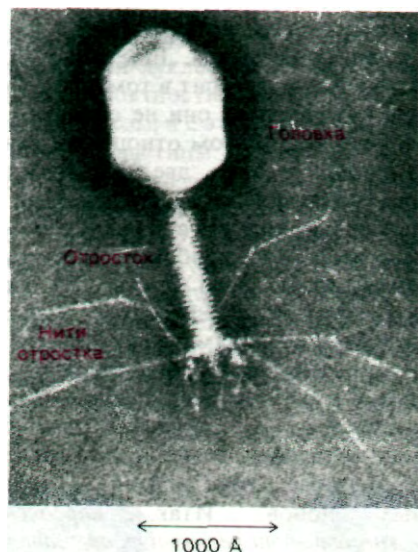


Рис. 30.10. Электронная микрофотография фага Т4. (Williams R. C., Fisher H. W., An electron micrographic atlas of viruses, C. C. Thomas, Springfield, Illinois, 1974. Печатается с любезного разрешения издателя.)

Таблица 30.2. **Гены фага Т4** [Wood W.B., Revel H.R., Bacteriol. Rev., 40, 860 (1976)]

Тип	Число
Метаболические, необходимые	22
Метаболические, необходимыми не являются	60
Сборка частицы, структурные белки	40
Сборка частицы, другие белки	13
Общее число идентифицированных генов	135

знание. Предранные и ранние гены транскрибируются и транслируются до того, как синтезируется ДНК фага Т4. Некоторые белки, кодируемые этими генами, обеспечивают выключение синтеза клеточных макромолекул. Вскоре после заражения ДНК клетки-хозяина распадается под действием дезоксирибонуклеазы, кодируемой одним из ранних генов фага Т4. ДНК самого фага Т4 не гидролизуется под действием этого фермента, поскольку в ней нет кластеров (сгруппированных остатков) цитозина. В ДНК фага Т4 вместо цитозина находится гидроксиметилцитозин (ГМЦ). К тому же остатки ГМЦ в ДНК Т4 гликозилированы.

Эти производные цитозина включаются в ДНК бактериофага Т4 благодаря действию нескольких фagosпeцифических ферментов, синтезирующихся на ранней стадии заражения. Один из них гидролизует dCTP с образованием dCMP, чтобы воспрепятствовать включению dCTP в ДНК фага Т4. Затем второй фермент вводит в dCMP гидроксиметильную группу, и образуется

5-гидроксиметилцитидилат. Третий фермент превращает 5-гидроксиметилцитидилат в трифосфат, который служит субстратом для ДНК-полимераз. Наконец, четвертый фермент гликозилирует некоторые из содержащихся в ДНК остатки гидроксиметилцитозина.

Синтез *поздних белков* сопряжен с репликацией ДНК фага Т4. На этом этапе образуются белки капсида и лизоцим. Когда сборка вирионов потомства завершена, лизоцим гидролизует клеточную стенку бактерии и разрушает ее. Примерно через 20 мин после заражения возникает около двухсот новых вирусных частиц.

30.5. В упорядоченной сборке фага Т4 участвуют вспомогательные белки и протеазы

Сборка фага Т4 - гораздо более сложный процесс, чем сборка ВТМ, так как капсид фага Т4 значительно сложнее по своей структурной организации и содержит примерно 40 различных белков. Еще тринадцать дополнительных белков (по сравнению с ВТМ) участвуют в сборке фага Т4, но не входят в состав капсида. Механизм сборки этого вируса был исследован с помощью сочетания генетических, биохимических и электронно-микроскопических методов. Работы Вильяма Вуда и Роберта Эдгара (William Wood, Robert Edgar), посвященные мутантам фага Т4, дефектным по способности к сборке, позволили установить следующее.

1. *Существует три основных пути превращений, которые приводят к образованию вируса.* В результате этих превращений независимо формируются головка, отросток и нить отростка (рис. 30.11). Если блокировать образование одного из перечисленных компонентов, это не повлияет на синтез двух других.

2. *Каждая из этих последовательностей превращений идет в строго определенном порядке.* Все белки капсида синтезируются одновременно во второй половине цикла заражения. Таким образом, строгой последовательности сборки головки, отростка и нитей отростка способствуют структурные особенности самих промежуточных продуктов. *Ни один из этих процессов ассоциации не может идти с заметной скоростью, пока не закончится предыдущий.* Возможно, часть



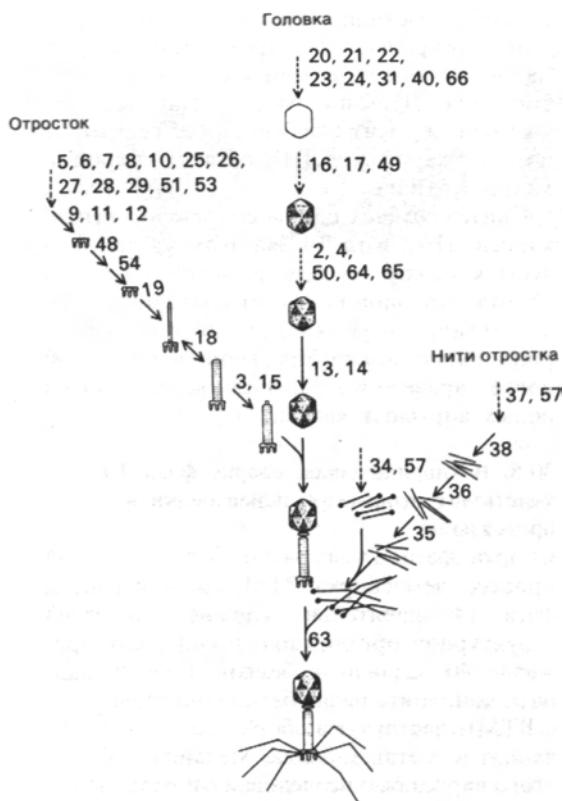


Рис. 30.11. Морфогенез фага Т4. Числа возле стрелок обозначают гены, продукты которых необходимы для соответствующих этапов сборки. (Wood W.B., Genetic mechanisms of development, Ruddle F. H., ed., Academic Press, 1973, p. 29.)

энергии связывания на каждом этапе используется для снижения энергии активации следующего процесса ассоциации и таким образом увеличивает его скорость.

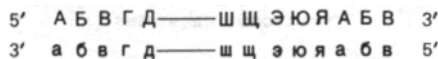
3. Головка и отросток должны быть полностью собраны, прежде чем они соединяются друг с другом. Затем готовые нити отростка присоединяются к базальной пластинке. И в этом случае строгая последовательность событий обеспечивает выход только готовых вирусных частиц.

Образование вирионов фага Т4 идет не только путем самосборки. Важную роль на некоторых этапах этого процесса играют *вспомогательные (морфопоэтические) белки*

и *протеазы*. Например, для образования центральной «втулки» базальной пластинки отростка нужны три белка, которые не входят в состав собранного отростка. Эти вспомогательные белки служат временными шаблонами для ассоциации компонентов «втулки». Протеазы играют важную роль в сборке головки. Основной белок головки с массой 45 кДа, который называется *gp23** (*gp* - от англ. gene product - продукт гена), образуется из предшественника *gp23* с массой 55 кДа. Расщепление происходит в тот момент, когда головка частично собрана; это свидетельствует о том, что оно запускает механизм втягивания ДНК в головку. Известны еще три белка головки, которые расщепляются в процессе сборки. Таким образом, фаг Т4 образуется путем самосборки и сборки с участием вспомогательных (морфопоэтических) белков и ферментов.

30.6. В репликации фага Т4 участвует конкатемерный промежуточный продукт

При репликации линейных молекул ДНК, в частности ДНК фага Т4, возникает особая проблема. 5'-концы новообразованной дочерней ДНК застроены не до конца, так как РНК-затравка была удалена, но не была замещена ДНК (рис. 30.12). Напомним, что ДНК-полимераза не способна синтезировать цепи ДНК *de novo* в направлении 3'→5' (разд. 24.19). При репликации кольцевых молекул ДНК такой проблемы не возникает, так как 3'-конец новой цепи служит затравкой для завершения синтеза дочерней цепи. Как же решают эту проблему фаг Т4 и другие вирусы, геном которых представляет собой линейную ДНК? Важным указанием на то, как решается эта проблема, послужило открытие, что эти линейные молекулы обладают *концевой избыточностью*, т.е. последовательность оснований левого конца ДНК в точности повторяется на правом конце:



К тому же при репликации этих молекул ДНК образуются длинные *конкатемеры*. Эти открытия позволили предложить механизм заполнения 5'-концов дочерних цепей. Поскольку одноцепочечные концы новообразованных двухцепочечных молекул взаимно комплементарны, они быстро реассоциируют (рис. 30.13). Эта комплементар-

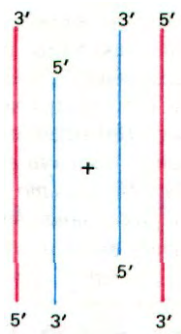


Рис. 30.12. 5'-концы новосинтезированных линейных молекул ДНК застроены не до конца. Родительские цепи ДНК показаны красным цветом, а дочерные - синим.

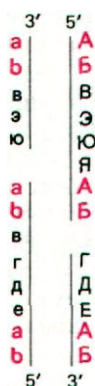


Рис. 30.13. Конкатемерный промежуточный продукт репликации линейных двухцепочечных молекул ДНК. Двухцепочечные молекулы ДНК с незастроенными концами ассоциируют друг с другом благодаря спариванию комплементарных одноцепочечных концов (АВ с аb). Затем одноцепочечные пробелы застраиваются.

ность - следствие концевой избыточности последовательности оснований. В конкатемерной цепочке, состоящей из повторяющихся звеньев - двухспиральных молекул фаговой ДНК, 3'-конец одной молекулы служит затравкой для заполнения 5'-конца другой.

30.7. ДНК фага Т4 вводится в преобразованную головку

Как образуется молекула ДНК, соответствующая одному фаговому геному, и как она упаковывается в головку? Эта проблема невероятно сложна: ДНК имеет контурную длину 56 мкм и при этом должна уместиться в головку, длина которой по большей оси 0,1 мкм. К тому же объем ДНК ($1,8 \cdot 10^4$ мкм³) ненамного меньше объема головки ($2,5 \cdot 10^4$ мкм³). *A priori* имеются две возможности: ДНК может входить в преобразованную головку или головка может собираться вокруг «ядра» конденсированной ДНК. Выделение пустых головок фага, способных упаковать ДНК, прямо доказывает, что ДНК фага Т4 вводится в преобразованные головки (рис. 30.14). В то время как ДНК входит в головку и свертывается в структуру, напоминающую моток пряжи, происходит расщепление нескольких белков головки. Одновременно происходит разбухание головки. Наконец, когда в головку входит фрагмент ДНК, соответствующий длине одного генома, конкатемерная



Рис. 30.14. Схема упаковки ДНК при сборке головки фага Т4.

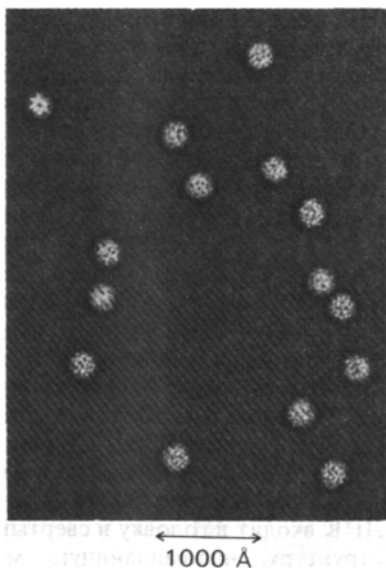


Рис. 30.15. Электронная микрофотография вируса кустистой карликовости томата. (Печатается с любезного разрешения д-ра Robley Williams.)

ДНК расщепляется. Нуклеаза действует не путем узнавания какой-либо определенной последовательности, а расщепляет ДНК именно в тот момент, когда головка наполнена. Этим и объясняется тот факт, что концы молекул ДНК Т4 обладают концевой избыточностью, ДНК упаковывается таким образом, что она может быть очень быстро введена в бактерию при следующем цикле заражения. Чем обеспечивается такая паразитическая подвижность, остается загадкой.

30.8. Гибкость белка оболочки ВККТ позволяет ему образовывать икосаэдрический капсид

Вирус кустистой карликовости томатов (ВККТ) - сферический вирус, иллюстрирующий другой принцип организации вируса (рис. 30.15). ВККТ содержит одну молекулу РНК длиной 4800 нуклеотидов, окруженную оболочкой из 180 идентичных белковых субъединиц массой 41 кДа. Как уложены эти субъединицы оболочки? Максимально возможная симметрия изотермической оболочки достигается в случае икосаэдра и имеет порядок 60 (рис. 30.16, А). Другими

словами, не более 60 идентичных субъединиц могут быть упакованы в сферическую оболочку с соблюдением *абсолютной* симметрии. Но ВККТ и ряд других сферических вирусов содержат 180 идентичных субъединиц. *Биологическое преимущество построения оболочки из 180 вместо 60 субъединиц такого же размера состоит в том, что в более крупный вирион можно упаковать больше нуклеиновой кислоты. Это достигается не нарушением симметрии, а некоторым ее ослаблением* (рис. 30.16, Б). Рентгеноструктурный анализ структуры ВККТ высокого разрешения, проведенный Стивенем Харрисоном (Stephen Harrison), показал, что химически идентичные субъединицы его оболочки можно отнести к трем группам (А, В и С), каждая из которых состоит из 60 белков, подчиняющихся строгой икосаэдрической симметрии. В то же время молекулы из разных групп расположены по отношению друг к другу несколько по-разному; поэтому их называют *квазиэквивалентными*.

Как объяснить квазиэквивалентность с физической точки зрения? Рентгеноструктурный анализ показал, что каждая субъединица состоит из S-домена, образующего часть поверхности оболочки; Р-домена, выступающего наружу; N-концевого участка, направленного внутрь. Р- и S-домены всех субъединиц имеют примерно одинаковое строение. В то же время угол между Р- и S-доменами в субъединицах группы С сильно отличается от угла в субъединицах А и В. Р- и S-домены соединены *шарниром*, обеспечивающим поворот на угол до 20°. Еще одно отличие состоит в том, что N-концевая часть в субъединицах группы С упорядочена, а в субъединицах А и В находится в беспорядочной конформации. *Благодаря такой гибкости структурной организации субъединицы, принадлежащей к различным группам, могут взаимодействовать друг с другом почти идентичным образом, что необходимо для самосборки.* С другой стороны, РНК внутри частицы, по-видимому, не находится в какой-нибудь определенной конформации. Гибкие N-концевые участки субъединиц оболочки проникают внутрь и взаимодействуют с РНК.

30.9. Бактериальные рестрикционные эндонуклеазы расщепляют чужеродные молекулы ДНК

Мы уже видели, что фаг Т4 обладает ферментативной системой для избирательного расщепления ДНК клетки-хозяина. Подоб-

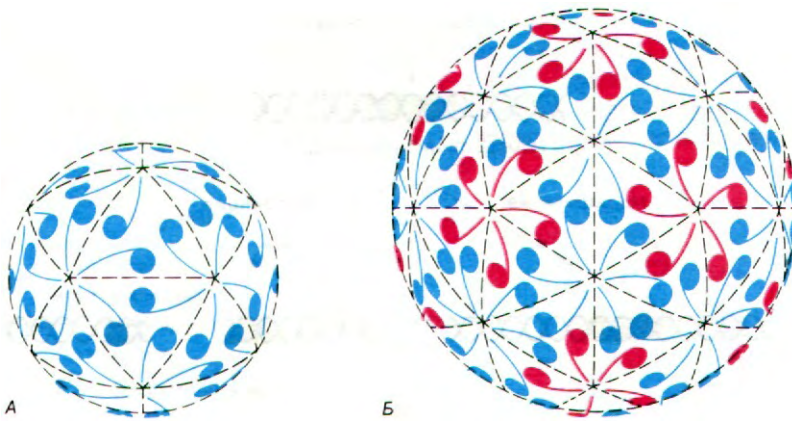


Рис. 30.16. Икосаэдрическая поверхностная решетка, демонстрирующая упаковку 60 совершенно одинаковых субъединиц (А) и 180 квазиэквивалентных субъединиц (Б). Обратите внимание, что все контакты типа «хвост к хвосту» на рис. А образуются кольцевыми группами по пять субъединиц, а на рис. Б некоторые такие контакты образуются группами по пять, а другие — по шесть субъединиц. [Harrison S.C., Trends Biochem. Sci., 3,4 (1978).]

но этому, у бактерий имеются ферменты, называемые *рестриктурирующими эндонуклеазами*, которые расщепляют чужеродные молекулы ДНК. Эти ферменты были открыты в результате наблюдения, что фаги, выращенные на одном штамме бактерий (например, *E.coli* В), плохо растут на другом штамме (*E.coli* К) и наоборот. Такое явление, когда фаг плохо растет на штамме, отличном от того, на котором он был выращен, было названо *рестрикцией*. Однако небольшая часть фага (примерно 10^{-5}) избегает рестрикции и в дальнейшем хорошо растет на новом хозяине. При этом фаги теряют способность расти на старом хозяине.

Все эти данные показали, что специфическая модификация в клетках-хозяевах защищает фаг от рестрикции. Затем Вернер Арбер (Werner Arber) продемонстрировал, что специфическая модификация клеткой-хозяином на самом деле воздействует на фаговую ДНК и что рестрикция обусловлена деградацией ДНК фага. ДНК клеткой-хозяина

и другие молекулы ДНК, содержащиеся в клетках-хозяевах, метилированы по определенным участкам. Те же участки узнает и рестриктурирующая эндонуклеаза, которая расщепляет только неметилированные последовательности. Таким образом, метилирование определенного основания в последовательности-мишени (участке узнавания) препятствует гидролизу ферментом рестрикции (рис. 30.17). Момент, в который происходит модификация, имеет принципиально важное значение: бактериальная ДНК не подвергается расщеплению, потому что она метилируется раньше. Только что реплицированная бактериальная хромосома, метилированная только по одной - родительской - цепи, устойчива к действию фермента рестрикции. Такая наполовину модифицированная ДНК становится полностью метилированной до начала следующего цикла репликации.

У бактерий обнаружено два типа систем рестрикция-модификация. В системах типа I активность метилазы и нуклеазы ассоциирована с крупным комплексом, состоящим из нескольких субъединиц. Например, такие комплексы у *E.coli* К и В состоят из полипептидных цепей трех типов. α -Цепь обладает эндонуклеазной активностью, β -цепь - метилазной активностью, а γ -цепь несет участок узнавания ДНК. Ферменты типа I нуждаются в S-аденозилметионине и в АТФ для проявления как нуклеазной, так и метилазной активности. Ферменты типа I расщепляют немодифицированную ДНК в случайном месте на расстоянии 1900 пар оснований или более в 5'-сторону от участка

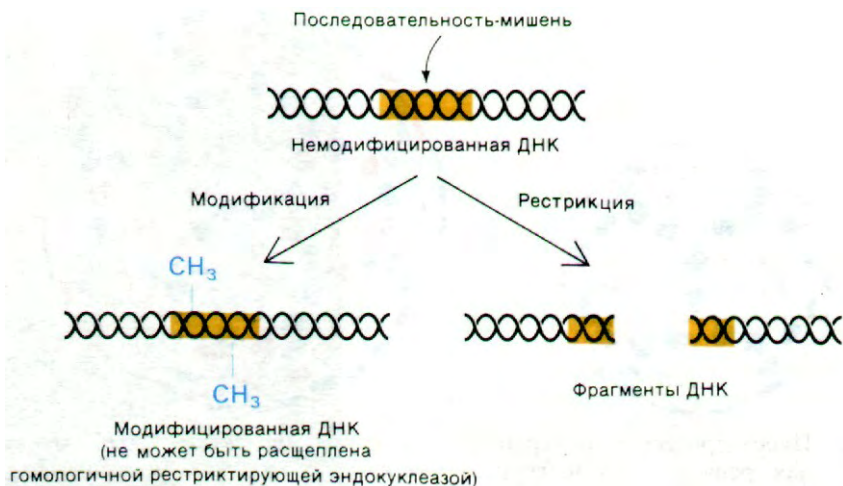


Рис. 30.17. Метилирование участков узнавания (последовательностей-мишеней) защищает их от расщепления рестриктирующей эндонуклеазой.

узнавания¹ и одновременно гидролизуют АТФ. В системах типа II, наоборот, метилазы и нуклеазы разделены. S-аденозилметионин служит донором метальной группы в реакции модификации, но не участвует в расщеплении ДНК. Еще одно отличие состоит в том, что нуклеазы и метилазы типа II не нуждаются в АТФ. Самое удивительное, что места расщепления нуклеазами типа II весьма специфичны. Как уже обсуждалось в одной из предыдущих глав (разд. 24.27), многие из этих ферментов узнают определенную последовательность из 4-6 пар оснований и гидролизуют в каждой цепи единственную строго определенную фосфодиэфирную связь в этой области. Отличительная особенность этих участков расщепления состоит в том, что они симметричны относительно оси вращения второго порядка (рис. 30.18). Ферменты рестрикции - незаменимый инструмент в исследовании структуры ДНК (разд. 24.27) и создании новых молекул ДНК (разд. 31.9).

30.10. Стратегия репликации РНК-содержащих вирусов

Репликация РНК-содержащих вирусов представляет собой особую проблему, так как в незараженных клетках-хозяевах нет ферментов для синтеза РНК по РНК-матрице. Следовательно, РНК-содержащие вирусы должны нести генетическую информацию для синтеза РНК-зависимой РНК-полимеразы (которую называют также РНК-репликазой или РНК-синтетазой) или для РНК-зависимой ДНК-полимеразы (называемой также обратной транскриптазой). РНК-содержащие вирусы удобно классифицировать в зависимости от РНК, содержащейся в вирионе, и мРНК. По определению мРНК представляет собой (+) РНК, а ком-

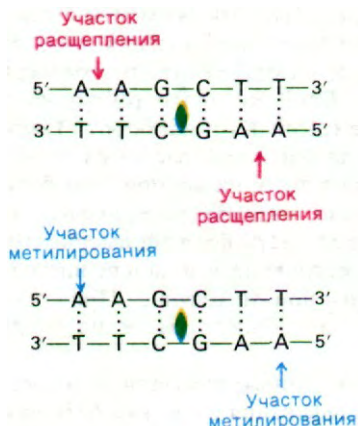


Рис. 30.18. Специфичность рестриктирующей эндонуклеазы *Hind III* из *Haemophilus influenza* и соответствующей метилазы. Зеленым цветом показана ось симметрии второго порядка.

¹ Арбер изучал систему рестрикции—модификации типа I на содержащем одноцепочечную ДНК фage fd, поэтому он мог указать положение участка расщепления относительно участка узнавания так, как это сделано в тексте.- Прим. перев.

Пикорнавирусы -

группа мелких (*pica*) РНК-содержащих (*pna* - от англ. RNA) вирусов. Одна одноцепочечная молекула (+)РНК окружена икосаэдрической белковой оболочкой диаметром 270 А. К пикорнавирусам относятся вирус полиомиелита, риновирус (вызывающий обычную простуду) и вирус ящура крупного рогатого скота.



Рис. 30.19. Способы экспрессии генов РНК-содержащих вирусов. [Baltimore D., Bacteriol. Rev., 35, 326 (1971).]

плементарная ей цепь - (-)РНК. Известны четыре пути репликации и транскрипции РНК-содержащих вирусов (рис. 30.19). Вирусы 1-го класса (например, вирус полиомиелита) - вирусы, *содержащие положительную цепь РНК*. Они синтезируют (-)РНК, которая используется в качестве матрицы для образования (+)мРНК. Вирусы 2-го класса (например, вирусы бешенства) содержат *отрицательную цепь РНК*, у них (-)РНК вириона служит матрицей для синтеза (+)мРНК. Вирусы 3-го класса (например, реовирусы) содержат *двухцепочечную РНК*; (±)РНК вириона направляет асимметрический синтез (+)мРНК. Наиболее необычны вирусы 4-го класса - *ретровирусы* (например, вирус саркомы Рауса). У них выражение генетической информации, содержащейся в (+)РНК вириона, опосредовано образованием ДНК, которая служит матрицей для синтеза (+)РНК. Таким образом, поток генетической информации ретровирусов направлен от РНК к ДНК и затем обратно к РНК.

30.11. Белки вируса полиомиелита образуются путем множественного расщепления гигантского предшественника
Вирус полиомиелита состоит из одноцепочечной (+)РНК длиной 7,5 kb, заключенной в икосаэдрический капсид. Проникнув

в цитоплазму клетки-хозяина, эта молекула РНК вириона используется в качестве матрицы для синтеза белка. Она транслируется рибосомами клетки-хозяина с образованием белков капсида и особой РНК-полимеразы, работающей по РНК-матрице (*РНК-репликазы*). Затем РНК-репликаза синтезирует (-)цепи на матрице (+)РНК вириона (рис. 30.21). (-)РНК в свою очередь служит матрицей для синтеза множества (+)цепей, которые участвуют в синтезе белка или упаковываются в капсиды и дают новые вирионы.

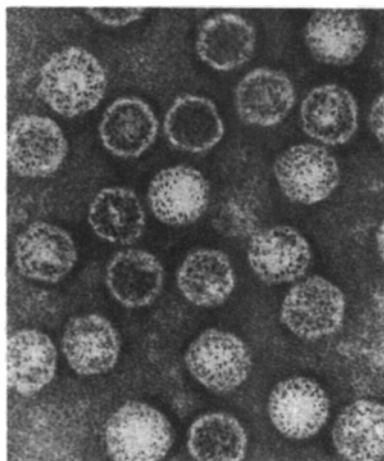


Рис. 30.20. Электронная микрофотография частиц вируса полиомиелита. (Печатается с любезного разрешения д-ра John Finch.)

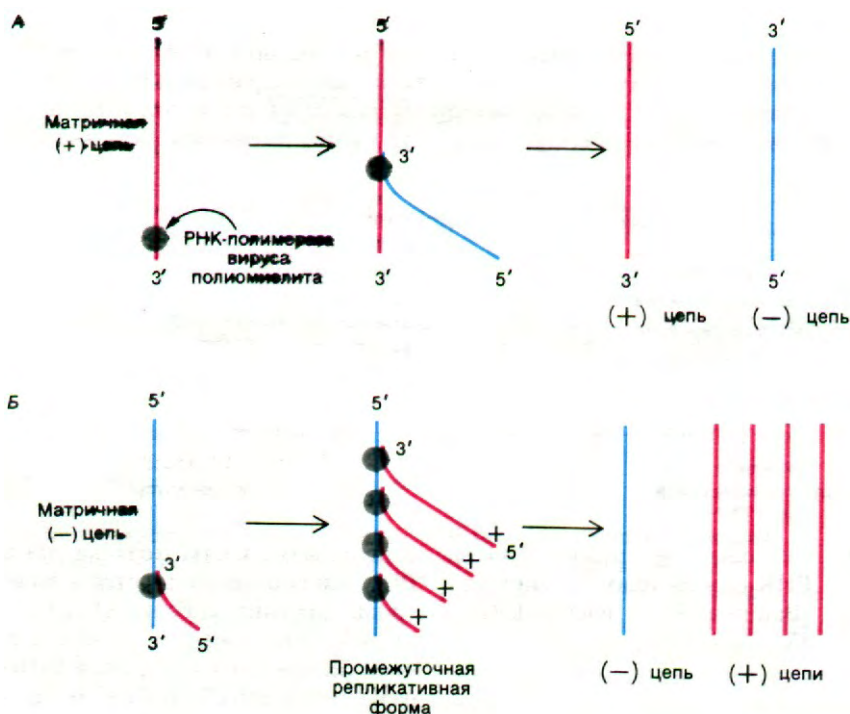


Рис. 30.21. Репликация РНК вируса полиомиелита.

Поразительная особенность выражения генов вируса полиомиелита состоит в том, что (+)РНК вириона служит матрицей для синтеза непрерывной полипептидной цепи, содержащей более 2000 аминокислотных остатков. Дэвид Балтимор (David Baltimore) показал, что этот *гигантский полипептид* *расщепляется протеазами клетки-хозяина на семь белков*: четыре белка оболочки, одну РНК-репликазу и два белка, функция которых пока еще неизвестна (рис. 30.22). Новообразованная полипептидная цепь расщепляется на три куска, которые затем подвергаются дальнейшему расщеплению. В частности, два белка оболочки образуются из предшественника на завершающей стадии сборки вириона.

Почему вирус полиомиелита синтезирует свои белки таким на первый взгляд сложным путем? По-видимому, у него нет выбора. Напомним, что в *эукариотических клетках молекула мРНК по непонятной пока причине может при трансляции дать только одну полипептидную цепь*. Прокарио-

тические мРНК, наоборот, сплошь и рядом полицистронны (например, мРНК лактозного оперона). Таким образом, вирус полиомиелита использует расщепление полипротеина, чтобы преодолеть ограничения, накладываемые особенностями животной клетки-хозяина.

30.12. С геномной РНК вируса везикулярного стоматита транскрибируется пять моноцистронных мРНК

Вirus везикулярного стоматита вызывающий легкое заболевание крупного рогатого скота, и вирус бешенства - примеры второго способа выражения генов. Их вирионы содержат одноцепочечную молекулу (-)РНК, которая не может служить матрицей.

Поэтому первый этап ее экспрессии - синтез (+)РНК. Поскольку в незараженных клетках нет РНК-репликазы, вирусы должны содержать этот фермент в составе вириона и вводить его при заражении в клетку. Действительно, два из пяти белков вириона ВВС осуществляют репликацию РНК. Для проявления инфекционности вируса необходимы белок L массой 200 кДа (от англ. large - большой) и белок NS массой 45 кДа (от англ. nonstructural - неструктурный), присутствующие в небольших количествах. Геномная РНК находится в комплексе с большим числом молекул белка нуклео-

Рабдовирусы -

вирусы, имеющие форму палки. К ним относятся вирусы везикулярного стоматита и бешенства. Название происходит от греческого слова *rhabdo*, что означает «палочка».

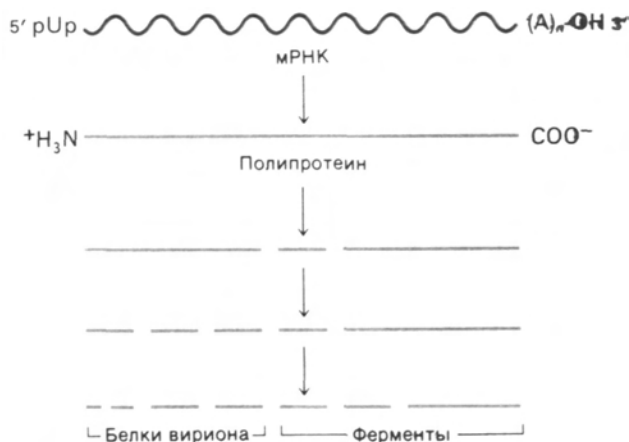


Рис. 30.22. Синтез белков вируса полиомиелита путем множественного расщепления гигантского полипептидного предшественника.

капсид N массой 50 кДа - основного белка вириона. ВВС заключен в липидную двуслойную мембрану, которую он захватывает из плазматической мембраны в процессе отпочковывания от клетки (рис. 30.23). Белок G (от англ. glycoprotein - гликопротеин) массой 65 кДа, кодируемый вирусом, образует шипы, выступающие из этой мембраны. Белок матрикса М массой 29 кДа располагается между оболочкой и нуклеокапсидом. Эти пять белков ВВС образуются при трансляции пяти (+)мРНК, а не путем расщепления одного полипротеина. Та же самая РНК-репликаза синтезирует и длинную (+)РНК, содержащую всю генетическую информацию вируса. Эта полная (+)РНК в свою очередь служит матрицей для синтеза (-)РНК, которая упаковывается и дает новые вирионы.

30.13. Геном реовируса состоит из десяти различных молекул двухцепочечной РНК Реовирус, содержащий двухцепочечную РНК, поражает клетки млекопитающих и представляет третий тип вирусных генетических систем. Сердцевина вириона содержит десять различных двухцепочечных молекул ($\pm$) РНК, ассоциированных с белка-

ми. Проникнув в клетку-хозяина, вирион теряет наружную икосаэдрическую оболочку, состоящую из трех видов белков. Удаление этой оболочки активирует РНК-полимеразу, содержащуюся в сердцевине вириона. Эта РНК-зависимая полимераз полностью транскрибирует 10 молекул (+)РНК, так что образующиеся (+)мРНК имеют такую же длину, как фрагменты ге-

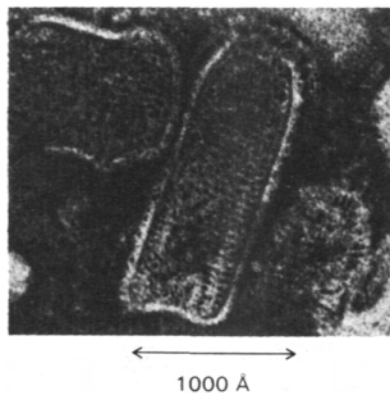


Рис. 30.23. Электронная микрофотография вируса везикулярного стоматита. (Williams R. C., Fisher H. W., Electron Micrographic Atlas of Viruses, C. C. Thomas, 1974. Печатается с любезного разрешения издателя.)

вирус, содержащий двухцепочечную РНК, выделен из дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта людей и других млекопитающих; насколько известно, он не вызывает заболевания. Приставка *reo* составлена из первых букв английских слов *respiratory enteric orphan*, что означает энтеро-респираторный вирус-сирота (сирота, поскольку бродит «не пристроенный» ни к какой болезни).

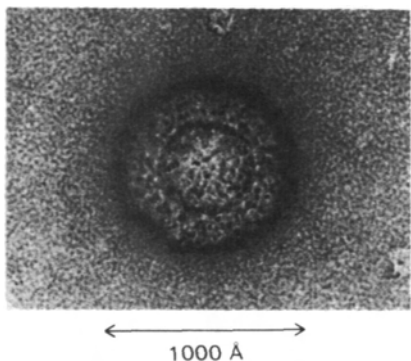


Рис. 30.24. Электронная микрофотография реовируса. (Williams R. C., Fisher H. W., An electron micrographic atlas of viruses, C. C. Thomas, 1974. Печатается с любезного разрешения издателя.)

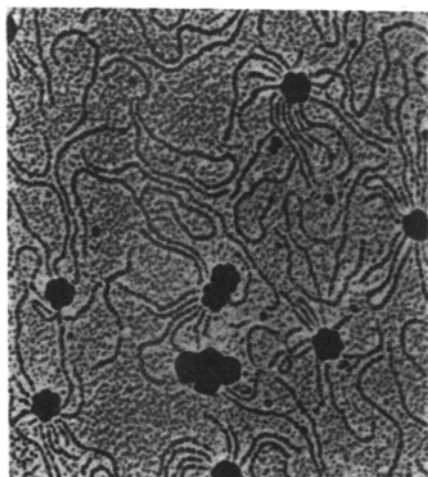


Рис. 30.25. Синтез мРНК в сердцевине реовируса. Молекулы мРНК выглядят нитями, отходящими от темных телец-сердцевин. [Bartlett N. M., Gillies S. G., Bullivant S., Bellamy A. R., J. Virol., 14, 324 (1974).]

нома. ($\pm$)РНК матрица транскрибируется *асимметрично и консервативно*, т.е. образуются только (+)РНК, а исходные ($\pm$)РНК разрушаются. В сердцевине вириона к 5'-концам этих мРНК присоединяются «колпачки» под действием ферментов. Затем эти концы выходят через каналы в сердцевине (рис. 30.25). Следовательно, сердцевина - высокоорганизованная система синтеза мРНК. Каждая из этих десяти мРНК дает при трансляции один белок. Затем весь набор десяти (+)РНК соединяется с некоторыми вирусными белками и образует предшественник сердцевины («прекор»), в котором синтезируется десять (-)цепей.

Для чего геном реовируса разделен на фрагменты? Как уже было указано выше, вирусы животных не могут иметь полицистронных мРНК. Вирус полиомиелита решает эту проблему путем расщепления гигантского белка-предшественника, а вирус везикулярного стоматита транскрибирует РНК вириона в виде коротких мРНК, каждая из которых соответствует одному белку. *Стратегия реовируса состоит в том, чтобы иметь отдельную «хромосому» для каждого синтезируемого белка.*

Четвертый путь выражения генетической информации РНК-содержащих вирусов - использование ДНК-посредника, интегрирующей с геном клетки-хозяина. Это более сложная генетическая система, которую используют ретровирусы (РНК-содержащие онкохеродные вирусы). Мы обсудим ее ниже в этой главе (разд. 30.19).

30.14. Мелкие РНК-содержащие фаги содержат перекрывающиеся гены

Такие РНК-содержащие фаги, как R17 (MS2, F2) и Q_{β} , относятся к простейшим вирусам. Они имеют форму правильного многогранника и диаметр около 200 Å. Капсид этих близкородственных фагов содержит 180 молекул белка оболочки массой 14 кДа и одну молекулу белка А (созревания) массой 38 кДа. Кроме того, одноцепочечная (+)РНК кодирует одну из субъединиц репликазы. До сих пор считалось, что эти мел-

кие РНК-содержащие вирусы содержат только три гена. Однако обнаружение мутанта фага, образующего нормальные вирионы, но не способного при этом лизировать клетку-хозяина, повлекло за собой поиск еще одного кодируемого вирусом белка. Действительно, у РНК-содержащих фагов имеется четвертый ген, кодирующий белок, необходимый для лизиса бактерио-хозяина. Ген этого белка лизиса перекрывается с генами белка оболочки и субъединицы репликазы (рис. 30.26). Эти *мелкие РНК-содержащие фаги, подобно маленькому ДНК-содержащему фагу φX174* (разд. 26.11), *используют перекрывающиеся гены для того, чтобы вместить больше информации в свои маленькие геномы.* Молекула (+)РНК вириона служит матрицей и для синтеза четырех белков, и для синтеза (–)РНК. Затем (–)РНК используется в качестве матрицы для образования множества копий (+)РНК. Таким образом, по генетической системе эти фаги напоминают вирус полиомиелита.

Репликаза, синтезирующая (+)- и (–)-цепи фаговой РНК, – очень интересный фермент. Он проявляет высокую специфичность к гомологичной фаговой РНК. Поэтому молекулы РНК клетки-хозяина не конкурируют с фаговой РНК при репликации. Qβ-репликаза состоит из четырех субъединиц, из которых только одна кодируется фаговой РНК. Три другие субъединицы репликазы – белки клетки-хозяина, которые фаг приспособил для собственных нужд. Два из них – факторы элонгации синтеза белка EF-Tu и EF-Ts, а третий – один из компонентов 30S-субчастицы рибосомы. Так фаг Qβ создает весьма специфичный фермент максимально экономичным способом.

Регуляторные механизмы обеспечивают правильную временную последовательность трансляции и репликации. (+)РНК служит одновременно матрицей для синтеза белка и для синтеза (–)РНК. Было бы нежелательно, чтобы оба процесса происходили одновременно на одной и той же (+)РНК, поскольку рибосомы, движущиеся в направлении 5'→3', сталкивались бы с репликазой, движущейся в направлении 3'→5'. Этого не происходит, так как Qβ-репликаза сильно ингибирует связывание рибосом с (+)РНК до тех пор, пока не синтезируется достаточное число молекул (–)РНК.

Четыре фаговых белка синтезируются в различных количествах. Белок оболочки, который синтезируется на протяжении всего

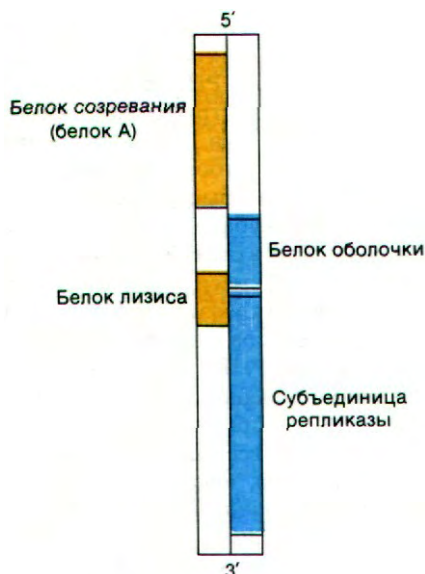


Рис. 30.26. Перекрывающиеся гены в РНК вирусов R17 и Qβ. Одна рамка считывания показана желтым цветом, другая – синим.

периода инфекции, – основной продукт трансляции. Одна из причин этого состоит в том, что рибосомы гораздо прочнее связываются с участком инициации соответствующего цистрона, чем с другими участками инициации в (+)РНК. Кроме того, белок оболочки подавляет трансляцию гена репликазы, блокируя его участок инициации. Таким образом, белок оболочки – специфический реллессор трансляции. Белок А транслируется только с незаконченных молекул (+)РНК, так как в полных молекулах РНК его участок инициации блокирован в результате спаривания оснований. Вторичная структура полной молекулы РНК позволяет транслировать лишь небольшое количество белка А.

30.15. Дарвиновская эволюция фаговой РНК вне клетки

Очистка РНК фага Qβ и Qβ-репликазы от примесей нуклеаз позволила Солу Спигелману (Sol Spiegelman) изучать эволюционные события вне живой клетки. Один из вопросов был сформулирован следующим образом: *что произойдет с молекулами РНК, ес-*

ли единственное предъявляемое к ним требование - это как можно быстрее размножаться? Молекулы РНК и репликазы фага Q β и рибонуклеозидтрифосфаты инкубировали в течение 20 мин. Такое время инкубации способствует отбору мутантных молекул РНК, которые быстро реплицируются. Образец этой инкубационной смеси перенесли и разводили в свежей порции стандартной реакционной смеси, содержащей Q β -репликазу и рибонуклеозидтрифосфаты. Проводили 75 переносов и затем анализировали образовавшиеся РНК. Продолжительность инкубации постепенно снижали, так как молекулы РНК на протяжении эксперимента реплицировались все быстрее. Самым удивительным было то, что после 75 переносов («поколений») длина молекул РНК составляла всего 12% длины исходной РНК фага Q β . Нуклеотиды, ненужные для репликации, были утрачены, так как укороченные молекулы реплицировались быстрее. Основное ограничение, которое накладывали условия этого эксперимента, - сохранение в мутантных молекулах иницирующей последовательности, которую узнает Q β -репликаза.

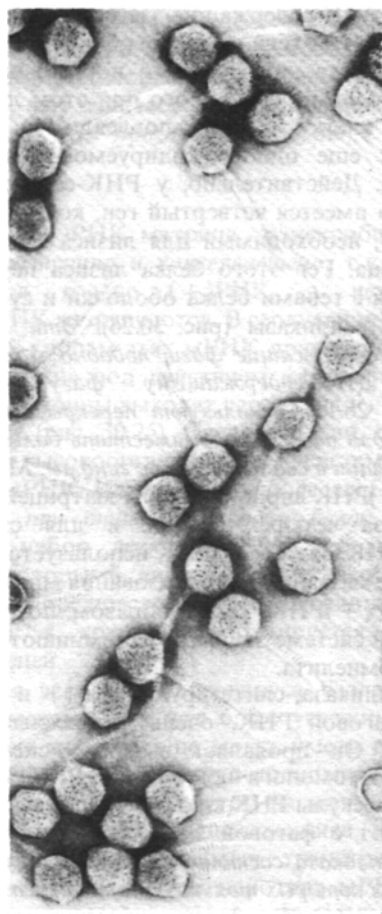


Рис. 30.27. Электронная микрофотография фага λ . (Печатается с любезного разрешения д-ра A. Dale Kaiser.)

30.16. Лизогенные фаги могут включать свою ДНК в состав ДНК клетки-хозяина
У некоторых бактериофагов существует два возможных пути, по которым может пойти их дальнейшее развитие после заражения клетки-хозяина: они могут размножаться и лизировать зараженную клетку (*литический путь развития*) или же их ДНК может включиться в ДНК зараженной клетки, не проявляя способности к размножению и лизису (*лизогенный путь развития*). Вирусы, которые не всегда убивают клетку-хозяина, называются *умеренными*. Лучшее всего из умеренных вирусов изучен фаг λ (рис. 30.27); мы уже говорили о нем раньше в связи с регуляцией транскрипции (разд. 28.11). Напомним, что репрессор фага λ связывается с двумя группами операторных участков O_L и O_R и что он регулирует свой собственный синтез.

ДНК вириона λ - линейная двухцепочечная молекула длиной 48 kb. 5'-конец каждой ее цепи представляет собой одноцепочечную последовательность из 12 нуклеотидов. Эти последовательности называются *липки-*

ми концами, так как они взаимно комплементарны и могут спариваться друг с другом. На самом деле они соединяются сразу после заражения. В результате 5'-фосфат каждой цепи оказывается рядом со своим собственным 3'-гидроксильным концом. ДНК-лигаза клетки-хозяина заделывает разрывы, и в результате образуется *кольцевая молекула ДНК фага λ* (рис. 30.28).

Репликация этой кольцевой молекулы ДНК фага λ происходит путем взаимодействия белков, кодируемых фагом λ , с репликационными механизмами клетки-хозяина. В другом случае кольцевая ДНК фага λ может включиться в бактериальную хромосому с помощью одного акта реципрокной рекомбинации между специфическими участками ДНК фага λ и *E.coli* длиной по 15 пар

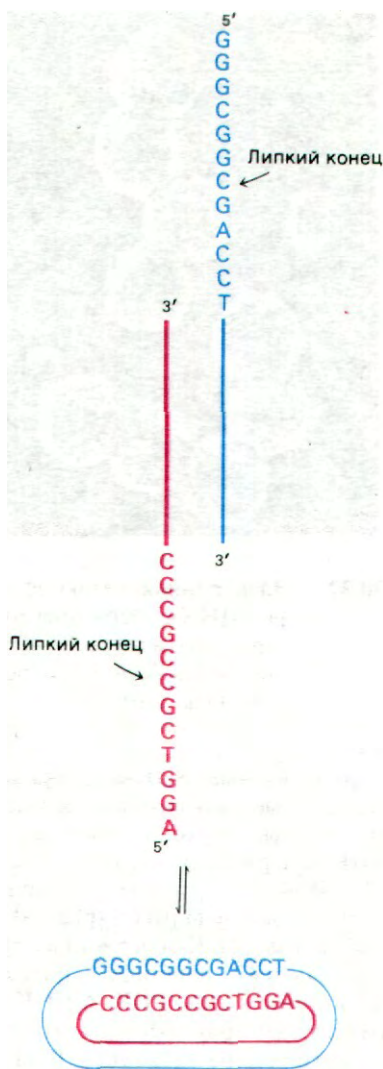


Рис. 30.28. Превращение линейной ДНК фага λ в кольцевую форму.

оснований. Сайт (участок) прикрепления фага λ в ДНК *E.coli* обозначается *att λ* и располагается между генами галактозного и биотинного оперонов *galE* и *bioA*. Последовательность оснований *att λ* можно символически обозначать В-В' (от англ. bacterial - бактериальный). Специфический сайт прикрепления в фаге λ называется *att* и локализован рядом с генами *int* (от англ. integrate - интегрировать) и *xis* (от англ. excise - вырезать). Последовательность оснований *att* обозначается Р-Р' (от англ. phage - фаг). Белок *int* узнает последовательность Р-Р' в фаговой ДНК и последовательность В-В' в ДНК *E.coli*. Затем происходит взаимный перенос: Р соединяется с В', а В - с Р'. Эта схема (рис. 30.29 и 30.30) была первоначально предложена Алланом Кэмпбеллом (Allan Campbell) на основании генетических данных.

Теперь ДНК фага λ составляет часть молекулы ДНК *E.coli*. Эта форма называется *профагом*, а клетка *E.coli*, содержащая профаг, - *лизогенной бактерией*. Профаг стабилен в отсутствие белка *xis*. Транскрипция гена *xis* блокируется репрессором фага λ (разд. 28.11). Когда репрессия снимается, белки *xis* и *int* совместно катализируют разрыв последовательностей В-Р' и Р-В', и снова происходит взаимный перенос (рис. 30.30): Р соединяется с Р', а В с В'; при этом снова получаются кольцевая молекула ДНК фага λ и нелизогенная хромосома *E.coli*. Главная особенность этой системы рекомбинации заключается в том, что белок *int* сам по себе не может узнавать две новые последовательности на концах профага (В-Р' и Р-В'), поэтому они устойчивы. Таким образом, внедрение фага происходит в присутствии одного белка *int*, тогда как вырезание профага - только в присутствии обоих белков - *int* и *xis*.

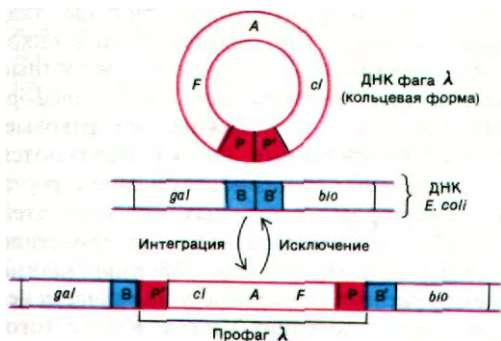


Рис. 30.29. Схема реципрокной рекомбинации ДНК фага λ и ДНК *E.coli*.

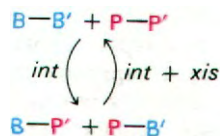


Рис. 30.30. Интеграция и исключение ДНК фага λ . Это неполная схема, так как некоторые факторы, участвующие в этих процессах, пока не идентифицированы.

30.17. Ретровирусы и некоторые ДНК-содержащие вирусы могут вызывать рак у чувствительных клеток-хозяев

В 1911 г. Пейтон Раус (Peyton Rous) приготовил бесклеточный фильтрат из опухоли соединительной ткани, которая спонтанно возникла у курицы и ввел его нормальным цыплятам. Как ни странно, у реципиентов развились высокозлокачественные опухоли такого же типа, которые называются *саркомами*. Кроме того, Раус обнаружил, что опухолеродный фактор фильтрата, известный в настоящее время под названием *вируса саркомы Рауса* (RSV) или *вируса саркомы птиц* (ASV) (рис. 30.31), можно размножить путем последовательного пассирования в курах. Вирус саркомы птиц относится к группе *РНК-содержащих опухолеродных вирусов* (онкогенных РНК-содержащих вирусов). Эти вирусы содержат в составе вирионов (+)РНК и размножаются с использованием двухспиральной ДНК-посредника. Поэтому их называют *ретровирусами*. Ретрови-

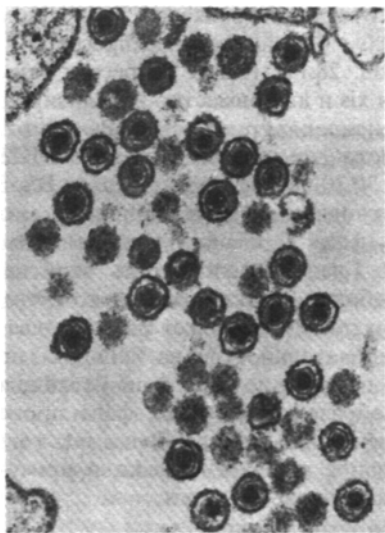


Рис. 30.31. Электронная микрофотография вируса саркомы птиц (вируса саркомы Рауса), относящегося к ретровирусам. Сильноокрашивающиеся вирионы расположены вблизи поверхности зараженной клетки цыпленка. (Печатается с любезного разрешения д-ра Samuel Dales.)

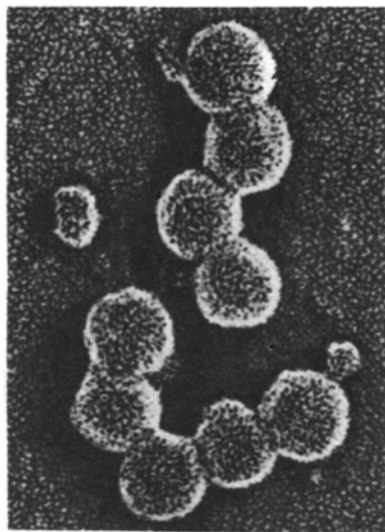


Рис. 30.32. Электронная микрофотография ДНК-содержащего опухолеродного вируса SV-40. (Печатается с любезного разрешения д-ра Jack Griffith.)

русы - единственные РНК-содержащие вирусы, способные вызывать рак. Кроме того, злокачественные опухоли может вызывать ряд ДНК-содержащих вирусов. *Обезьяний вирус 40* (SV-40) и *вирус полиомы* принадлежат к группе паповавирусов (рис. 30.32); из всех *онкогенных ДНК-содержащих* вирусов они изучаются наиболее интенсивно. Особый интерес к этим РНК- и ДНК-содержащим вирусам привлекает то, что они содержат всего четыре-пять генов. В индукции рака участвует всего один или два вирусных гена, и потому исследователи питают надежду выяснить механизм их действия.

Для изучения рака на молекулярном уровне были разработаны системы тканевых культур. При проникновении онкогенного вируса в подходящие животные клетки они становятся постоянно *трансформированными*, т.е. похожими на раковые. Трансформированные клетки отличаются от нормальных особенностями своего роста и характером клеточных поверхностей (табл. 30.3). Самое разительное изменение состоит в том, что *трансформированные клетки растут непрерывно и хаотически* независимо от соседних клеток. Кроме того, трансформированные клетки содержат *вирусоспецифическую ДНК, интегрированную с геномом клетки-хозяина*. Этим объясняет-

Характер роста

При введении чувствительным животным образуют опухоли
Растут до гораздо более высокой плотности
Рост становится не ориентированным в пространстве и клетки отделяются от поверхности, на которой растут
В среду выделяются активаторы протеаз, что повышает инвазивность клеток
Снижается потребность в факторах роста сыворотки

Свойства поверхности

Появляются новые вирусоспецифические антигены
Один из белков наружной поверхности клеток - фибронектин - исчезает
Падает содержание ганглиозидов
На поверхности клетки появляются антигены плода
Скорость транспорта питательных веществ увеличивается
Способность к агглютинации под действием растительных лектинов увеличивается

Признаки присутствия опухолеродного вируса

Имеются последовательности вирусной ДНК
Имеются вирусоспецифические мРНК
Выявляются вирусоспецифические антигены

ся тот факт, что трансформация является наследуемым изменением фенотипа. Культуры, полученные из трансформированных колоний, навсегда сохраняют аномальные свойства трансформированных клеток. Кроме того, некоторые *трансформированные клетки, полученные из культуры ткани, при введении в достаточном количестве в подходящего хозяина образуют раковую опухоль.*

30.18. Вирусы SV-40 и полиомы могут вызывать продуктивную инфекцию или трансформацию клеток-хозяев

Вирусы SV-40 и полиомы содержат внутри икосаэдрической оболочки маленькую коль-

цевую двухспиральную ДНК. В некоторых клетках (они называются *пермиссивными клетками-хозяевами*) развитие этих вирусов идет по пути *литического цикла*, что приводит к образованию множества новых вирионов (рис. 30.33).

При продуктивной инфекции эти вирусы убивают клетки. В клетках других типов (*непермиссивных клеток-хозяев*) некоторые стадии экспрессии вирусного генома по непонятным причинам блокируются. Никакого вирусного потомства в них не образуется. Но небольшая часть клеток - порядка одной на 10^5 - *трансформируется* в результате интеграции вирусной ДНК с геномом клетки-хозяина.

К настоящему времени расшифрована полная последовательность 5243 пар оснований ДНК вируса SV-40, а многие аспекты его репликации и транскрипции интенсивно исследуются. Половина ДНК транскрибируется на ранней стадии инфекции, другая половина ДНК - на поздней стадии, одновременно с синтезом вирусной ДНК (рис. 30.34).

Точка начала репликации находится в той же области, что и начало транскрипции ранней и поздней областей. *Ранняя область* транскрибируется в направлении против часовой стрелки и кодирует Т-антиген (белок А), необходимый для инициирования репликации ДНК. Другой, иммунологически отличный белок - малый т-антиген - также кодируется ранней областью. При синтезе мРНК для Т-антигена происходит вырезание вставочной последовательности из первичного транскрипта.

Таким образом, вирус SV-40 использует аппарат сплайсинга клеточного ядра. Заслуживает внимания также последовательность оснований в точке начала репликации. Здесь имеются две последовательности длиной по 13 пар оснований, симметричных относительно оси второго порядка, а рядом находится АТ-богатая область:

CAGAGGCCGAGGCGGCCTCGGCCTCTGCATAAAATAAAAAAATT
GTCTCCGGCTCCGCCGGAGCCGGAGACGTATTTATTTTAAAAAT

Паповавирусы - группа ДНК-содержащих вирусов. Название составлено по названиям трех представителей группы: вирусов папилломы, полио́мы и вакуолизирующего вируса (SV-40).

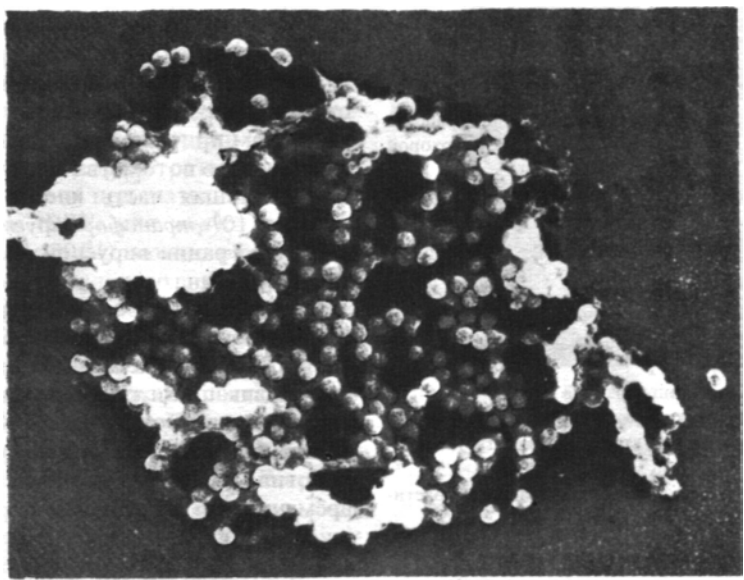


Рис. 30.33. Электронная микрофотография фрагмента ядерной мембраны клетки, зараженной вирусом SV-40. Видны ядерные поры и множество вирионов. (Печатается с любезного разрешения д-ра Jack Griffith.)

С этим участком связывается Т-антиген. Транскрипция *поздней области* происходит по направлению часовой стрелки от начала репликации (рис. 30.34) и приводит к синтезу трех белков капсида: VP1, VP2 и VP3. И в этом случае происходит удаление вставочных последовательностей из первичного транскрипта. Три мРНК, по-видимому, образуются в результате различных реакций сплайсинга. N-концевая последовательность аминокислот VP3 перекрывает 70% С-концевой последовательности VP2. Кроме того, перекрывающийся участок из 22 нуклеотидов читается в одной рамке считывания при синтезе VP2 и VP3 и в другой рамке при синтезе VP1. Так, *ограниченное количество генетической информации у вируса SV-40 используется с максимальной*

эффективностью. Еще один пример генетической экономии - то, что SV-40 не синтезирует собственных белков для упаковки ДНК. Новосинтезированная ДНК связывается с гистонами клетки-хозяина (рис. 30.35). Затем этот сверхспирализованный комплекс упаковывается в капсид с помощью белков VP1, VP2 и VP3. В конце концов вирионы потомства высвобождаются

Таблица 30.4. Белки, кодируемые вирусом SV-40

Белок	Масса, кДа	мРНК	Роль
Т-антиген (белок А)	94	Ранняя	Необходим для инициации, репликации ДНК и для трансформации
t-Антиген VP1	21 40	Ранняя Поздняя	Неизвестна Основной белок капсида
VP2	39	Поздняя	Минорный белок капсида
VP3	27	Поздняя	Минорный белок капсида

при лизисе клетки-хозяина, которая в результате гибнет.

В непермиссивных клетках происходит экспрессия ранней области генома SV-40, поздняя же область не реплицируется и не транскрибируется. *Небольшая часть этих клеток трансформируется в результате интеграции генома SV-40 с клеточной ДНК.* В отличие от интеграции ДНК фага λ в механизме интеграции ДНК SV-40, по-видимому, не участвуют специфические участки ни вирусной, ни клеточной ДНК. Для трансформации, а также, по всей вероятности, для поддержания трансформированного состояния необходимы оба вирусных антигена (Т и т). Введение таких трансформированных клеток чувствительным животным приводит к быстрому образованию опухолей. Основная цель ведущихся в настоящее время исследований вируса SV-40 состоит в том, чтобы выяснить, как экспрессия ранней области интегрированной формы этого вируса делает клетку раковой.

30.19. Ретровирусы содержат обратную транскриптазу, которая синтезирует двухспиральную ДНК, используя в качестве матрицы (+)РНК

Еще один класс опухолеродных вирусов - ретровирусы - содержат (+)РНК-геном в икосаэдрическом «футляре». Это сферическое нуклеопротеиновое «ядро» окружено оболочкой, состоящей из кодируемых вирусом молекул гликопротеина в двуслойной липидной оболочке, происходящей из плазматической мембраны клетки-хозяина. Обычно диаметр ретровирусов составляет 1000 А (см. рис. 30.31).

В 1964 г. Говард Темин (Howard Temin) наблюдал, что заражение такими РНК-содержащими опухолеродными вирусами, как вирус саркомы птиц, блокируется ингибиторами синтеза ДНК. Ингибиторы, например аметоптерин, 5-фтордезоксисуридин и цитозинарабинозид, эффективны в течение первых двадцати часов после введения вирусов. В результате этого открытия было высказано предположение, что для роста РНК-содержащих опухолеродных вирусов необходим синтез ДНК. К тому же образование частиц вирусного потомства подавляется актиномицином D. Известно, что этот антибиотик ингибирует синтез РНК по ДНК-матрице (разд. 25.18). Так зародилось предположение о том, что для размножения РНК-содержащих опухолеродных вирусов

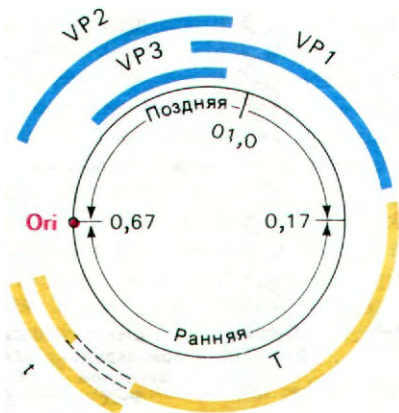


Рис. 30.34. Генетическая карта ДНК вируса SV-40, содержащая 5243 пары оснований. Ранняя область (транскрибируется в направлении против часовой стрелки) показана желтым цветом, поздняя область (транскрибируется по часовой стрелке) - синим, место начала репликации (ori) - красным.



Рис. 30.35. Электронная микрофотография формирующихся частиц опухолеродного вируса SV-40, ассоциированных с клеточной хромосомой. (Печатается с любезного разрешения д-ра Jack Griffith.)

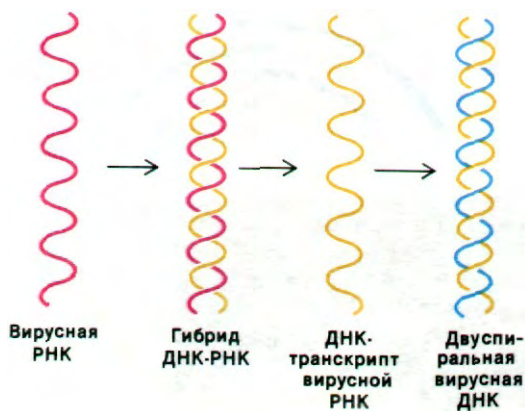


Рис. 30.36. Синтез ДНК по РНК-матрице обратной транскриптазой. Затравка не показана.

необходима транскрипция ДНК. Эти неожиданные данные привели Темина к мысли, что ДНК-содержащий провирус служит промежуточным продуктом в репликации и в онкогенном действии этих вирусов:

РНК-содержащий → ДНК-содержащий → РНК-содержащий
 опухолеродный провирус опухолеродный вирус

Выдвинутая Темином гипотеза, что генетическая информация может переходить от РНК к ДНК, была вначале холодно встречена большинством исследователей. Она требовала существования неизвестного тогда еще фермента, способного синтезировать ДНК по РНК-матрице (*РНК-зависимой ДНК-полимеразы*). В 1970 г. Темин и Балтимор (Temin, Baltimore) независимо открыли такой фермент, который называется *обратной транскриптазой*, в вирионах некоторых РНК-зависимых опухолеродных вирусов. Все вирусы этой группы, исследованные в дальнейшем, содержали обратную транскриптазу, поэтому их и называют *ретровирусами* (от англ. reverse transcriptase - обратная транскриптаза).

Жизненный цикл обычного ретровируса начинается со связывания вирионов со специфическими рецепторами на поверхности клетки-хозяина и проникновения в клетку. В цитозоле вирусная (+)РНК скидывает оболочку. Затем обратная транскриптаза,

содержавшаяся в вирусной частице, синтезирует (—)цепь ДНК. Тот же фермент расщепляет цепь геномной РНК в составе гибрида РНК—ДНК. Теперь обратная транскриптаза синтезирует (+)цепь ДНК, используя в качестве матрицы (—)цепь. Таким образом, обратная транскриптаза осуществляет три последовательные реакции: РНК-зависимый синтез ДНК, гидролиз РНК и ДНК-зависимый синтез ДНК (рис. 30.36).

Подобно другим ДНК-полимеразам, обратная транскриптаза синтезирует ДНК в направлении 5'→3' и неспособна к инициации цепей *de novo*. Откуда же берется затравка для синтеза вирусной ДНК? Процесс инициации весьма экономичен: (+)РНК вирусного генома содержит нековалентно связанную транспортную РНК (в вирусе саркомы птиц это - триптофановая тРНК), которая была захвачена в клетке-хозяине во время предыдущего цикла заражения. 3'-ОН-группа этой тРНК, основания которой спарены с геномной РНК, действует в качестве затравки синтеза ДНК. Как происходит репликация полной цепи (+)РНК?

Напомним, что при репликации любой *линейной* ДНК возникает особая проблема заполнения 5'-концов (разд. 30.6). Ретровирусы нашли очень остроумный выход из этого положения. Их геномы состоят не из одной, а из *двух* молекул (+)РНК (рис. 30.37). Эти молекулы связаны друг с другом водородными связями вблизи 5'-концов. К тому же (+)РНК содержит одну и ту же последовательность у 5'- и у 3'-конца. Эта концевая избыточность, по видимому, необходима для процесса репликации, как и в случае фага Т4 (разд. 30.6).

30.20. Ретровирусная ДНК

транскрибируется только в том случае, если она интегрирована с геном клетки-хозяина Двухспиральная вирусная ДНК переходит в кольцевую форму и проникает в ядро. Транскрипция ретровирусной ДНК происходит только после того, как она интегрируется с ДНК клетки-хозяина. Таким образом, *в жизненном цикле ретровирусов интеграция — этап обязательный*. В жизненном цикле онкогенных ДНК-содержащих вирусов, напротив, интеграция и продуктивная ин-

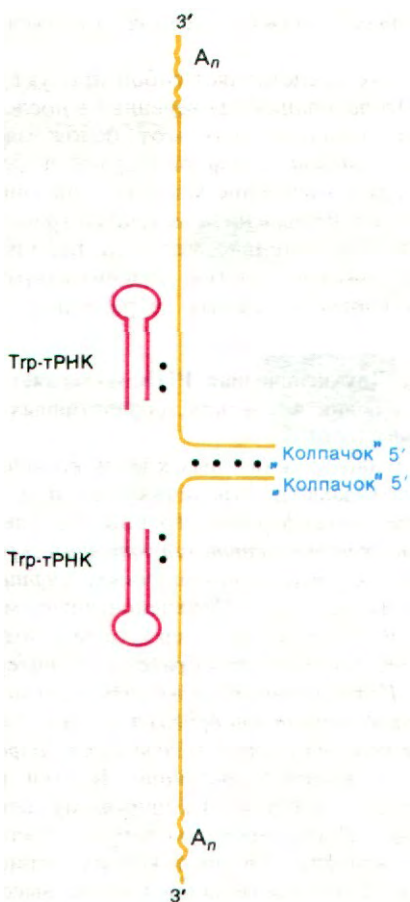


Рис. 30.37. Схематическое изображение генома вируса саркомы птиц. Две идентичные молекулы (+) РНК связаны между собой нековалентно. На 5'-концах находятся «колпачки», а на 3'-концах - poly(A)-последовательности. Молекула тРНК, которая служит затравкой, присоединена посредством спаривания оснований к каждой молекуле РНК.

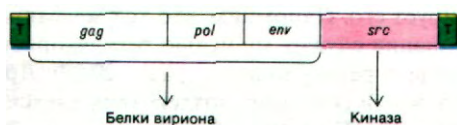


Рис. 30.38. Генетическая карта вируса саркомы птиц. Геном имеет длину 10 kb. Буквой Т обозначены концевые повторяющиеся последовательности.

фекция - альтернативные пути. Еще одно отличие заключается в том, что частота интеграции ретровирусной ДНК очень высока, как и следовало ожидать исходя из ее ключевой роли в продуктивной инфекции.

Геном вируса саркомы птиц длиной 10 kb содержит четыре гена (рис. 30.38). Три из них - *gag*, *pol* и *env* - необходимы для продуктивной инфекции. Ген *gag* кодирует полипротеин массой 76 кДа, который расщепляется на четыре белка, образующих сердцевину вируса. Ген *pol* кодирует обратную транскриптазу, состоящую из α - и β -субъединиц. α -Субъединица массой 65 кДа представляет собой фрагмент (массой 90 кДа) протеолиза β -цепи. Ген *env* кодирует гликопротеин оболочки вируса, необходимый для прикрепления вируса к поверхности клетки-хозяина. Четвертый ген - *src* (от англ. sarcoma - саркома) - не нужен для размножения вируса, но необходим для трансформации, как будет показано чуть ниже.

Различные вирусные мРНК, видимо, образуются в результате сплайсинга из первичного транскрипта длиной 10 kb. Затем они транспортируются в цитозоль и здесь транслируются. Геномная РНК и вирусные белки перемещаются к плазматической мембране и включаются в нее. Затем часть измененной мембраны отпочковывается и образует новые вирусные частицы. Таким образом, *продуктивная ретровирусная инфекция в отличие от инфекции онкогенными ДНК-содержащими вирусами не является литической. Ретровирусы обычно не убивают клеток-хозяев. Ретровирусная ДНК остается в геноме зараженной клетки и продолжает экспрессироваться. Кроме того, интегрированная вирусная ДНК реплицируется вместе с клеточной ДНК, поэтому дочерние клетки наследуют вирусный геном.*

30.21. Киназа, кодируемая геном *src* вируса саркомы птиц, участвует в трансформации Изучение некоторых *температурочувствительных мутантов* принесло новые данные о механизме трансформации под действием вируса саркомы птиц. При высокой температуре эти мутанты нормально размножаются, но не трансформируют клеток-хозяев, а при низкой температуре оба процесса протекают нормально. Кроме того, фибро-

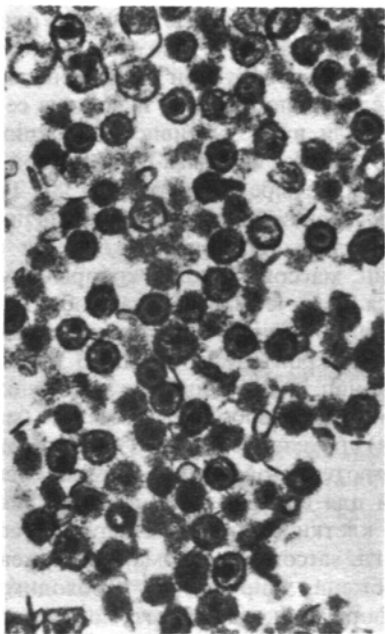


Рис. 30.39. Электронная микрофотография частиц вируса миелобластоза птиц. Введение этого онкохалеродного РНК-содержащего вируса новорожденным цыплятам вызывает в течение 3 недель злокачественную лейкемию. (Печатается с любезного разрешения д-ра Ursula Heine, Национальный институт раковых исследований.)

бласты, трансформированные этими мутантами при низкой температуре, при повышении температуры возвращаются к нормальному фенотипу. Сдвиг от трансформированного состояния к нормальному оказывается полностью обратимым. Анализ этих мутантов показал, что в процессе трансформации участвует только один вирусный белок - продукт гена *src*. Ген *src* получил свое название потому, что способен направлять синтез какого-то белка, вызывающего саркому. Важно подчеркнуть, что в таких мутантных клетках при высокой температуре вирусная ДНК остается интегрированной с клеточным геном. Следовательно, интеграция сама по себе не приводит к трансформации.

Для этого должен экспрессироваться ген *src*.

Что же представляет собой продукт гена *src*? Исследования, проведенные в последнее время, показали, что этот белок массой 60 кДа - киназа, фосфорилирующая белки. Проводится изучение мишени этой киназы, что позволит выяснить механизм трансформации. Поразительно, что один небольшой белок может полностью изменить характер роста клетки и сделать ее раковой.

30.22. Двухцепочечная РНК подавляет синтез белка в клетках, обработанных интерфероном

Устойчивость животных клеток ко многим вирусам заметно увеличивается под действием интерферонов - группы небольших белков, которые синтезируются и секретируются клетками позвоночных, инфицированными вирусом. Двухцепочечные молекулы РНК оказывают некоторое стимулирующее действие на образование интерферона. Интерфероны связываются с плазматической мембраной других клеток организма и стимулируют их способность сопротивляться вирусной инфекции. Клетки приобретают устойчивость к широкому спектру вирусов. Иммуность, которую обеспечивают антитела, наоборот, весьма специфична. Интерфероны обладают очень высокой активностью: всего 10^{-1} М достаточно для проявления выраженного противовирусного действия.

Интерферон повышает противовирусную устойчивость клеток путем увеличения синтеза трех ферментов: олигонуклеотид-синтетазы, эндонуклеазы и киназы. До тех пор пока сенсibilизированная клетка не заражается вирусом или не подвергается воздействию двухцепочечной РНК, эти три фермента бездействуют. Активация этих ферментов блокирует синтез белков двумя различными путями (рис. 30.40). Протеинкиназа фосфорилирует один из факторов инициации синтеза белка и тем самым инактивирует его. Напомним, что тот же фактор инициации служит мишенью регуляторного каскада в ретикулоцитах (разд. 29.27). Другой важный результат воздействия двухспиральной РНК на сенсibilизированные интерфероном клетки - стимулирование деградации мРНК. Эндонуклеаза активируется олигаденилатом, который называется 2,5А. Двухцепочечная РНК стимулирует синтетазу, образующую этот стимулятор эндону-

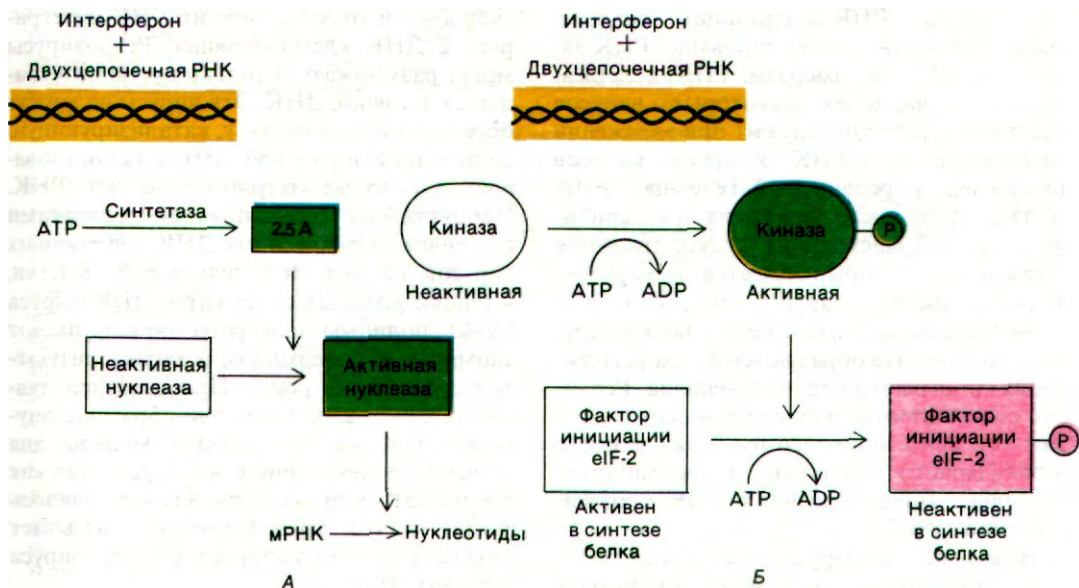


Рис. 30.40. Двухцепочечная РНК стимулирует расщепление мРНК (А) и ингибирует инициацию синтеза белка в клетках, обработанных интерфероном (Б). [Farrell P.J., Sen G.C, Dubois M. F., Ratner L., Slattery E., Lengyel P., Proc. Nat. Acad.Sci. USA, 75, 5896 (1978).]



клеазы. Было бы крайне интересно выяснить, играют ли эти регуляторные пути какую-либо роль в незараженной клетке, помимо того что они защищают ее от вирусов.

Заключение

Вирусы представляют собой плотно упакованную инфекционную нуклеиновую кислоту, окруженную защитной оболочкой. Они содержат ДНК или РНК, которые могут быть одно- или двухцепочечными. Простейшие вирусы имеют всего 3 гена, а наиболее сложные - около 250 генов. Вирусные оболочки в большинстве случаев состоят из

большого числа белковых субъединиц одного или нескольких видов, так как вирусы содержат крайне ограниченное количество генетической информации. Два основных способа укладки - цилиндрическая оболочка, обладающая спиральной симметрией, и сферическая оболочка, обладающая икосаэдрической симметрией. Частица вируса (вирион) табачной мозаики состоит из 2130 идентичных субъединиц, уложенных спирально вокруг одноцепочечной молекулы РНК; она образуется в результате самосборки, которая осуществляется путем присоединения белковых дисков к петле РНК. Вирус кустистой карликовости томатов образует икосаэдрическую оболочку, так как домены, из которых состоит его белок оболочки, связаны друг с другом подвижно. Сборка фага Т4 - гораздо более сложный процесс, в котором участвует примерно 50 белков. Три основных пути сборки ведут к независимому образованию головки, отростка и нитей отростка. Формирование фага Т4 идет в строго определенном порядке, в нем участвуют процессы самосборки и сборки с участием ферментов. Кроме того, важную роль в сборке фага Т4 играют вспомогательные (морфопоэтические) белки.

Незараженные клетки не могут синтезировать РНК по РНК-матрице. Следовательно, общее свойство РНК-содержащих виру-

сов (кроме РНК-содержащих опухолеродных вирусов) - это кодирование РНК-зависимой РНК-полимеразы. РНК, содержащаяся в вирионах некоторых вирусов (например, фага Q β), служит при заражении информационной РНК. У других вирусов (например, у реовирусов) геномная РНК должна сразу после заражения транскрибироваться. Транскрипция осуществляется ферментом, который имеется в вирионе. РНК-содержащие вирусы используют различные способы синтеза белка. Белки вируса полиомиелита образуются путем расщепления гигантского предшественника. Реовирус содержит отдельную «хромосому» для каждого синтезируемого им белка, а вирус везикулярного стоматита транскрибирует несколько моноцистронных РНК с одной геномной РНК.

Не все вирусы разрушают свои клетки-хозяева. Умеренный фаг λ может принимать форму дремлющего профага, когда его ДНК интегрирована с бактериальной хромосомой путем реципрокной рекомбинации. Этот профаг сохраняет способность к размножению и лизису, которую он проявляет, когда происходит его исключение из клеточной ДНК. Подобно этому, ДНК-содержащие опухолеродные вирусы SV-40 и полиомы либо размножаются и лизируют

свои клетки-хозяева, либо их ДНК интегрирует с ДНК клетки-хозяина. Ретровирусы могут размножаться только путем интеграции с клеточной ДНК. Эти вирусы содержат обратную транскриптазу, катализирующую синтез двухспиральной ДНК с использованием в качестве матрицы геномной РНК. Продуктивная инфекция ретровирусами в отличие от онкогенных ДНК-содержащих вирусов не является литической. Клетки, в геноме которых содержится ДНК вируса SV-40, полиомы или ретровируса, имеют аномальные поверхности и характеризуются нарушениями роста. При введении чувствительным животным они образуют опухоли. Эти вирусы - удобная модель для изучения молекулярных основ рака, так как они имеют всего около пяти генов. Удалось показать, что трансформацию вызывает киназа, которую кодирует ген *src* вируса саркомы птиц.

Устойчивость клеток животных ко многим - вирусам заметно увеличивается под действием интерферона - белка, который синтезируют и выделяют клетки, зараженные вирусом. Интерферон увеличивает образование трех ферментов, блокирующих синтез белка путем ингибирования фактора инициации и стимулирования деградации мРНК.

Биологические исследования представляют собой, в частности, упражнения по эстетике природы. Занимаясь биологией, мы получаем удовольствие главным образом оттого, что снова и снова осознаем, насколько экономичны, изящны и целесообразны те механизмы, которые случайно возникли в ходе эволюции и были закреплены отбором. Вирусолог может чувствовать себя одним из самых счастливых биологов, так как он может изучить избранный им объект до подробностей строения его отдельных молекул. Вирусолог наблюдает, как вирус - этот полнейший паразит - использует для своего существования наиболее общие принципы биологии клетки...

David Baltimore, Нобелевская лекция, 1976 г.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Butler P.J.G., King A., 1978. The assembly of a virus, Sci. Amer., 239(5), 62-69. (Сборка вируса табачной мозаики.)

Bishop J.M., 1980. The molecular biology of RNA tumor viruses:

a physician's guide, New Engl. J. Med., 303, 675-682.

Campbell A.M., 1976. How viruses insert their DNA into the DNA of the host cell, Sci. Amer., 235(6), 102-113.

Temin H.M., 1972. RNA-directed DNA synthesis, Sci. Amer., 226(1), 24-33.

Nathans D., 1979. Restriction endonucleases, simian virus 40, and the new genetics, Science, 206, 903-909.

Книги

Luria S.E., Darnell J.E., Jr. Baltimore D., Campbell A., 1978. General Virology (3rd ed.), Wiley. [Имеется перевод: Лурия С, Дарнелл Дж., Балтимор Д., Кэмпбелл Э. Общая вирусология. - М.: Мир, 1981.] (Доступное и увлекательное введение в вирусологию.)

Tooe J. (ed.), 1980, The Molecular Biology of Tumour Viruses (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory.

Williams R.C., Fisher H.W., 1974. An

Electron Micrographic Atlas of Airuses, Thomas. (Соержит превосходные электронные микрофотографии и оченъ увлекательные объяснения к ним.)

Строение вирусов

Bloomer A.C., Champness J.N., Bricogne G., Staden R., Klug A., 1978. Protein disk of tobacco mosaic virus at 2,8 Å resolution showing the interactions within and between subunits, *Nature*, **276**, 362-368.
Stubbs G., Warren S., Holmes K., 1977. Structure of RNA and RNA binding site in tobacco mosaic virus from 4-Å map calculated from X-ray fibre diagrams, *Nature*, **267**, 216-221.
Harrison S.C., Olson A.J., Schutt C.E., Winkler F.K., Bricogne G., 1978. Tomato bushy stunt virus at 2,9 Å resolution, *Nature*, **276**, 368-373.
Harrison S.C., 1978. Structure of simple viruses: specificity and flexibility in protein assemblies, *Trends Biochem. Sci.*, **3**-6.
Crick F.H.C., Watson J.D., 1957. Virus structure: general principles. In: Wolstenholme G. E. W. (ed.), Ciba Foundation Symposium on the Nature of Viruses, pp. 5-13.
Caspar D.L.D., Klug A., 1962. Physical principles in the construction of regular viruses, Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol., **27**, 1-24. (В этой классической статье рассматривается теория строения сферических вирусов.)

Сборка вирусов

Lebeurier G., Nicolaieff A., Richards K.E., 1977. Inside-out model for self-assembly of tobacco mosaic virus, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **74**, 149-153.
Butler P.J.G., Finch J. T., Zimmern D., 1977. Configuration of tobacco mosaic virus RNA during virus assembly, *Nature*, **265**, 217-219.
Wood W.B., 1978. Bacteriophage T4 assembly and the morphogenesis of subcellular structures, Harvey Lectures, **73**, 203-223.
Casjens S., King J., 1975. Virus assembly, *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 555-611.

Рестрикция и модификация

Smith D.H., 1979. Nucleotide sequence specificity of restriction endonucleases, *Science*, **205**, 455-462.
Arber W., 1979. Promotion and limitation of genetic exchange, *Science*, **205**, 361-365.

Интерферон

Friedman R.M., 1977. Antiviral activity of interferon, *Bacteriol. Rev.*, **41**, 543-567.
Farrell P.J., Sen G.C., Dubois M.F., Ratner L., Slatery E., Lengyel P., 1978. Interferon action: two distinct pathways for inhibition of protein synthesis by double-stranded RNA, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **75**, 5893-5897.
Burke D.C., 1977. The status of interferon, *Sci. Amer.*, **236**(4), 42-50.

Внеклеточная эволюция РНК фага Q β
Mills D.R., Peterson R.L., Spiegelman S., 1967. An extracellular Darwinian experiment with a selfduplicating nucleic acid molecule, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **58**, 217-224.

Лизогения

Lwoff A., 1966. The prophage and I. In: Cairns J., Stent G. S. and Watson J. D. (eds.), Phage and the Origins of Molecular Biology, pp. 88-99, Cold Spring Harbor Laboratory. (Захватывающий рассказ об открытии основ лизогении.)

Опухолеродные вирусы

Baltimore D., 1976. Viruses, polymerases, and cancer, *Science*, **192**, 632-636.
Timin H., 1976. The DNA provirus hypothesis: the establishment and implications of RNA-directed DNA synthesis, *Science*, **192**, 1075-1080.
Dulbecco R., 1976. From the molecular biology of oncogenic DNA viruses to cancer, *Science*, **192**, 437-440.
Bishop J.M., 1978. Retroviruses, *Ann. Rev. Biochem.*, **47**, 35-88.
Reddy V.B., Thimmapaya B., Dhar R., Subramanian K.N., Zain B.S., Plan J., Ghosh P.K., Celma M.L., Weissman S. M., 1978. The genome of simian virus 40, *Science*, **200**, 494-502.

ГЛАВА 31

Перестройки генов: рекомбинация, транспозиция и клонирование

Тема настоящей главы - перестройка генов путем перемещения крупных участков ДНК. Прежде всего мы обсудим *процесс генетической рекомбинации*, при котором новая молекула ДНК возникает путем разрыва и воссоединения цепей ДНК. Вероятность генетической рекомбинации существенно увеличивается при наличии обширных участков гомологии между взаимодействующими молекулами ДНК. Были выделены промежуточные продукты рекомбинации, а сравнительно недавно был охарактеризован и фермент, катализирующий взаимный обмен цепей ДНК. Затем мы обсудим *транспозицию* - перемещение гена из одной хромосомы в другую или с одного места на другое в пределах одной хромосомы. В отличие от общей рекомбинации для транспозиции не нужны протяженные участки гомологии. У прокариот присутствие так называемых *последовательностей-вставок*, или *IS-элементов* (от англ. insertion sequences), сообщает подвижность неродственным фрагментам ДНК, обеспечивая их соединение. Рекомбинация и транспозиция сыграли важную роль в эволюции, так как они *приводили к возникновению новых геномов*. В конце настоящей главы мы рассмотрим *конструирование новых комбинаций генов в пробирке* и их выражение в клетках-хозяевах. Гены можно ковалентно соединить с ДНК плазмид и вирусов с помощью рестриктирующих эндонуклеаз и ДНК-лигазы. *Такие рекомбинатные молекулы ДНК*

могут реплицироваться и экспрессироваться в подходящих клетках-хозяевах. Кроме того, мы обсудим важность клонирования генов и возможность его практического применения. Исследования рекомбинации и транспозиции и разработка методов клонирования идут исключительно быстрым темпом. В результате этих работ возникают новые плодотворные методы изучения геномов, которые позволяют глубже проникнуть в механизмы их эволюции и выражения.

31.1 В основе генетической рекомбинации лежат разрыв и воссоединение цепей ДНК
При генетической рекомбинации возникает молекула ДНК, последовательность которой происходит частично от одной родительской молекулы, а частично от другой. Исследования клеток *E. coli*, зараженных смесью фагов Т4, меченных ^{32}P и бромдезоксимурацилом, позволили получить представление о молекулярной природе рекомбинантных молекул. Плавающая плотность ДНК, меченной броммурацилом, значительно выше, чем плотность ДНК, меченной ^{32}P , так что родительские молекулы можно отделить друг от друга и от рекомбинантных молекул центрифугированием в градиенте плотности хлористого цезия (CsCl). Результаты опытов по центрифугированию показали, что после заражения смесью фагов рекомбинантные молекулы содержат и ^{32}P , и броммурацил. Структура гибридных молекул зависела от того, происходил ли во время их образования синтез ДНК. В отсутствие синтеза ДНК ^{32}P -ДНК в составе рекомбинантных молекул не была ковалентно соединена с меченной броммурацилом ДНК. При нагревании выше температуры плавления двухспиральных молекул гибрид диссоциировал на легкий и тяжелый компоненты. Фрагменты родительских молекул в этом гибриде удерживаются вместе в результате спаривания оснований; поэтому этот промежуточный продукт называется *составным* (рис. 31.3). Если же синтез

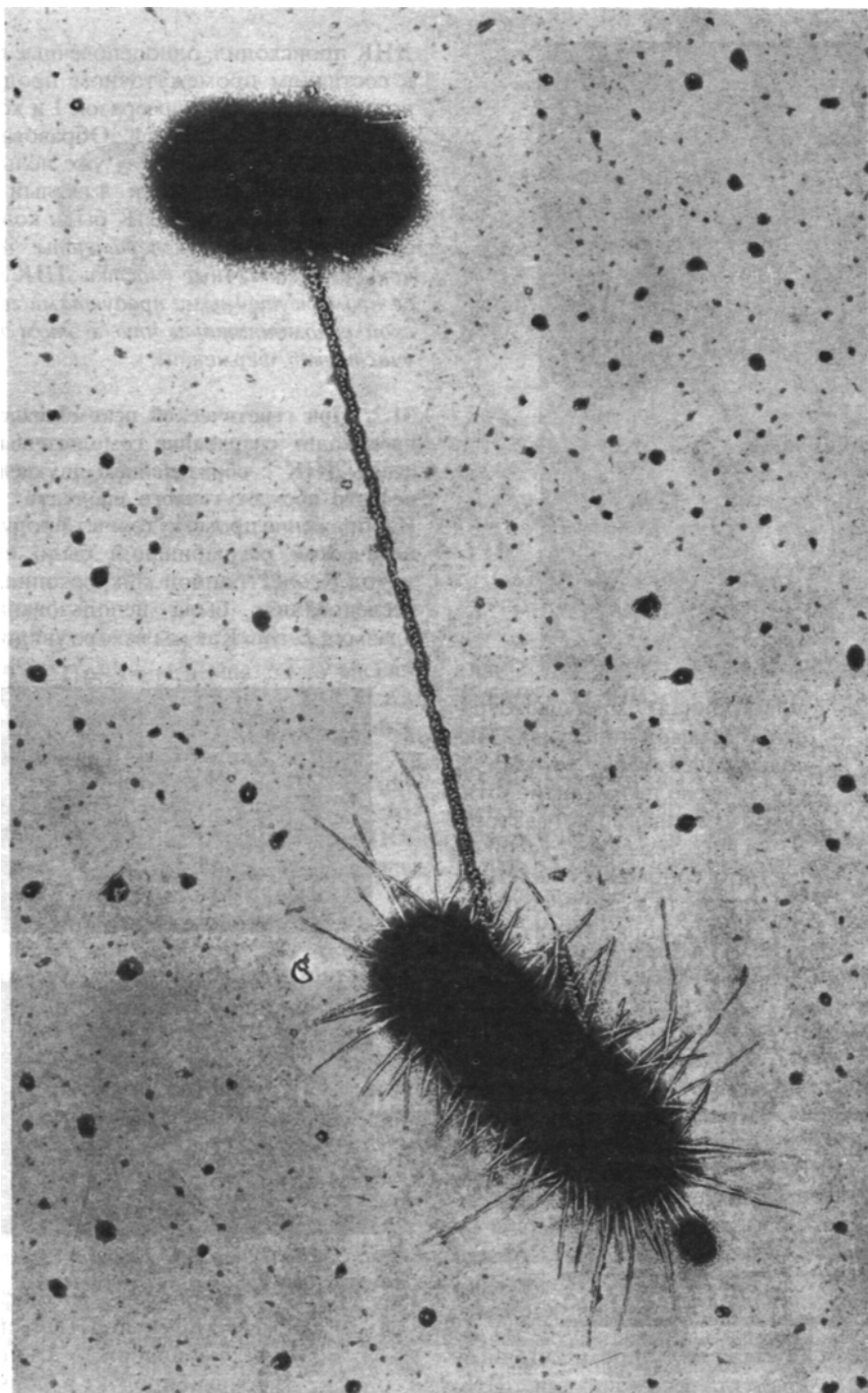


Рис. 31.1. Перенос генетической информации от одной клетки *E. coli* к другой. На этой электронной микрофотографии видны две клетки *E. coli*, соединенные при помощи пили во время конъюгации. ДНК переносится через

пиль из донорной клетки в акцепторную. (Печатается с любезного разрешения д-ра Charles Brinton и д-ра Judith Carnahan.)



Рис. 31.2. Электронная микрофотография кольцевой молекулы ДНК, содержащей гены устойчивости к нескольким антибиотикам. Такие плазмиды (факторы R - от англ. resistance - устойчивость) сообщают клеткам устойчивость к различным веществам, которая может передаваться другим клеткам. (Печатается с любезного разрешения д-ра Stanley Cohen.)

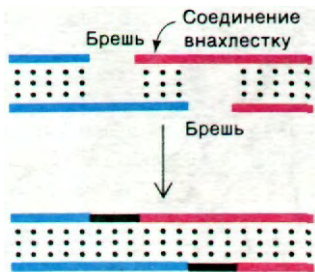


Рис. 31.3. Составной промежуточный продукт рекомбинации ДНК фага Т4 в зараженных бактериях. Меченная ^{32}P ДНК показана красным цветом, а ДНК, меченная бромурацилом, - синим.

ДНК происходил, одноцепочечные пробелы в составном промежуточном продукте заполнялись ДНК-полимеразой I и концы соединялись ДНК-лигазой. Образовавшуюся рекомбинатную молекулу уже нельзя было разделить на легкий и тяжелый компоненты, так как куски ДНК были ковалентно соединены. Эти эксперименты показали, что одноцепочечные участки ДНК являются промежуточными продуктами генетической рекомбинации и что в этом процессе участвуют ферменты.

31.2. При генетической рекомбинации происходит спаривание гомологичных цепей ДНК с образованием двухцепочечного промежуточного продукта

Изображение промежуточных продуктов генетической рекомбинации было получено методом электронной микроскопии. В этих исследованиях была использована ДНК плазмид *E. coli*. Как мы вскоре увидим (разд.

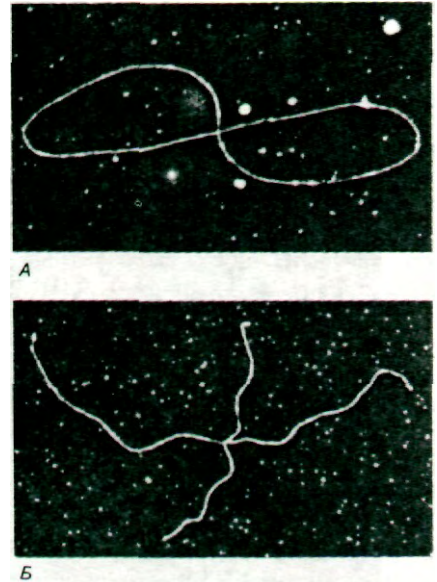


Рис. 31.4. Электронная микрофотография молекул ДНК в процессе рекомбинации: А - промежуточный продукт в форме восьмерки, состоящий из двух молекул ДНК; Б - при расщеплении этого промежуточного продукта рестриктирующей эндонуклеазой образуется х-форма. [Potter H., Dressier D., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76, 1089 (1976).]

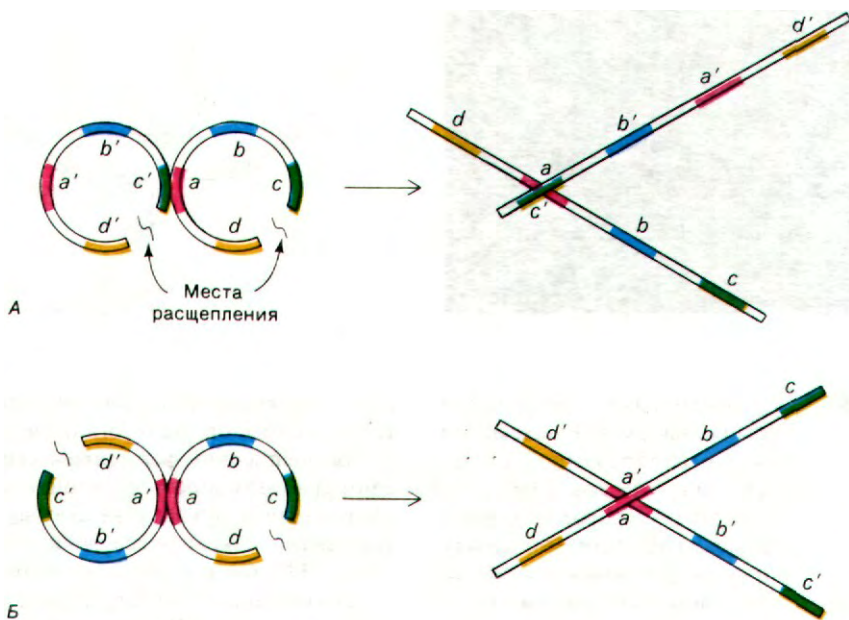
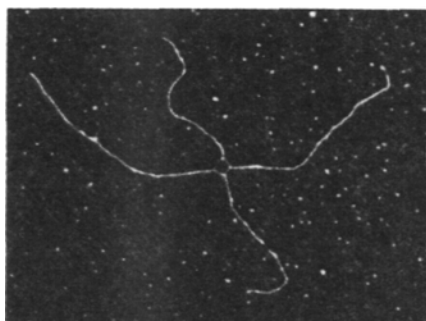


Рис. 31.5. Предполагаемая схема расщепления двух молекул ДНК, соединенных в негомологических (А) и в гомологичных (Б) участках. Наблюдаемая симметрия χ -форм (как на рис. 31.4, Б) показывает, что молекулы ДНК в форме восьмерок соединены в гомологичных участках.

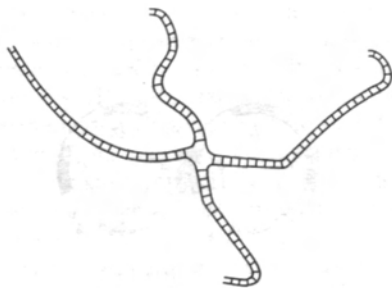
31.4), эти небольшие кольцевые двухцепочечные ДНК автономно реплицируются в бактериальной клетке. В присутствии хлорамфеникола число плазмид в одной бактерии увеличивается примерно с 20 до 1000. Этот антибиотик - ингибитор синтеза белка - подавляет репликацию бактериальной хромосомы, но не ингибирует репликации плазмид. Итак, бактериальная клетка оказывается наполненной молекулами плазмид, способными к рекомбинации. Электронная микроскопия плазмид, выделенных из этих клеток, показывает, что примерно четверть из них представляют собой димеры в форме восьмерок (рис. 31.4, А). Затем эти димеры расщепили рестриктирующей эндонуклеазой EcoRI, разрезающей мономер плазмиды в строго определенном месте. Если бы димеры были взаимозацепленными друг с другом мономерами или кольцами двукратной длины, то под действием рестриктирующей эндонуклеазы образовались бы палочки одинаковой

длины. С другой стороны, если два плазмидных кольца ковалентно соединены в области участка гомологии, должна быть видна структура с четырьмя ветвями в форме греческой буквы χ . В действительности почти все восьмерки превращаются в χ -форму (рис. 31.4, Б). Это служит надежным подтверждением, что *восьмерки представляют собой промежуточные продукты репликации*. В пользу этого вывода говорит и то, что у некоторых мутантов *E. coli*, дефектных по рекомбинации, восьмерки не образуются.

Какова структура области перекрестка двух геномов в восьмерках? Точка контакта (пересечения) χ -форм всегда делит всю структуру на две пары плеч равной длины. Это означает, что *геномы соединяются в области гомологии* (рис. 31.5). Если бы плазмиды соединялись в области негомологических последовательностей, то длины всех четырех плеч распределялись бы случайным образом. Кроме того, точка контакта располагается примерно с равной вероятностью вдоль всей плазмиды; отсюда следует, что *спаривание может происходить во многих положениях*. Способ соединения нитей в области перекреста был исследован с помощью его избирательной денатурации. На электронных микрофотографиях видно, что *четыре двухцепочечные молекулы в местах соединения двух геномов отходят от кольца*,



А



Б

Рис. 31.6. А - электронная микрофотография χ -формы; Б - схема молекулы, изображенной на фотографии. Участок гомологии (богатый АТ-парами оснований) был избирательно денатурирован формамидом, чтобы было видно соединение цепей в области перекреста. [Potter H., Dressier D., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 43, 973 (1979).]

состоящего из одиночных нитей (рис. 31.6). Затем этот промежуточный продукт может быть расщеплен и лигирован, так что образуются две пары различных рекомбинантных молекул (рис. 31.7).

31.3. Белок *гесА* катализирует АТР-зависимый обмен цепей ДНК при генетической рекомбинации

Процесс, который мы обсуждали до сих пор, называется *общей генетической рекомбинацией*, поскольку обмены могут происходить между любыми парами гомологичных последовательностей в родительских молекулах ДНК. У *E. coli* общая рекомбинация зависит от генов *rec*. В клетках *rec⁻* бактериальная ДНК не может рекомбинировать с экзогенными молекулами ДНК. Были идентифицированы три гена *rec*: *recA*, *recB* и *recC*. Белки *гесВ* (масса 140 кДа) и *гесС* (128 кДа) - две субъединицы одной нуклеазы, которая расплетает двухспиральную ДНК и расщепляет на куски сначала одну из расплетенных цепей, а затем дру-

гую. Эти куски, содержащие несколько сотен нуклеотидов, подвергаются дальнейшему расщеплению ферментом *гесВС*, обладающим активностью экзонуклеазы. Расплетающая и нуклеазная активности этого ферментного комплекса зависят от гидролиза АТР. *Скорее всего роль белка гесВС в рекомбинации сводится к образованию одноцепочечной ДНК, способной внедриться в двухцепочечную молекулу ДНК.*

Как одноцепочечная ДНК находит гомологичную последовательность в двухцепочечной молекуле, спаривается с комплементарной цепью и вытесняет вторую цепь? *Недавно было показано, что эту реакцию катализирует белок гесА с массой 40 кДа, который гидролизует АТР и использует выделяющуюся энергию.* Продукт этой реакции состоит из двухцепочечного участка и вытесненной одноцепочечной петли и имеет форму буквы D; он называется *D-петлей* (рис. 31.8). Образованию D-петли способствует белок, который специфически связывается с одноцепочечной ДНК. Этот белок играет также важную роль в репликации ДНК (разд. 24.21); он стабилизирует одноцепочечную ДНК, образовавшуюся под действием нуклеазы *гесВС*, и стимулирует внедрение этой цепи в гомологичную двухспиральную молекулу, катализируемую белком *гесА*.

31.4. Бактерии содержат плазмиды и другие подвижные генетические элементы

Общая генетическая рекомбинация приводит к возникновению новых комбинаций специфических *аллелей*, но не изменяет расположения *локусов*. Другими словами, при гомологичной рекомбинации *ABCDE* с *A'B'C'D'E'* легко получится *ABC'D'E'*, но не может получиться *ABXYZCDE* или *ABE*. Такие крупные генетические перестройки

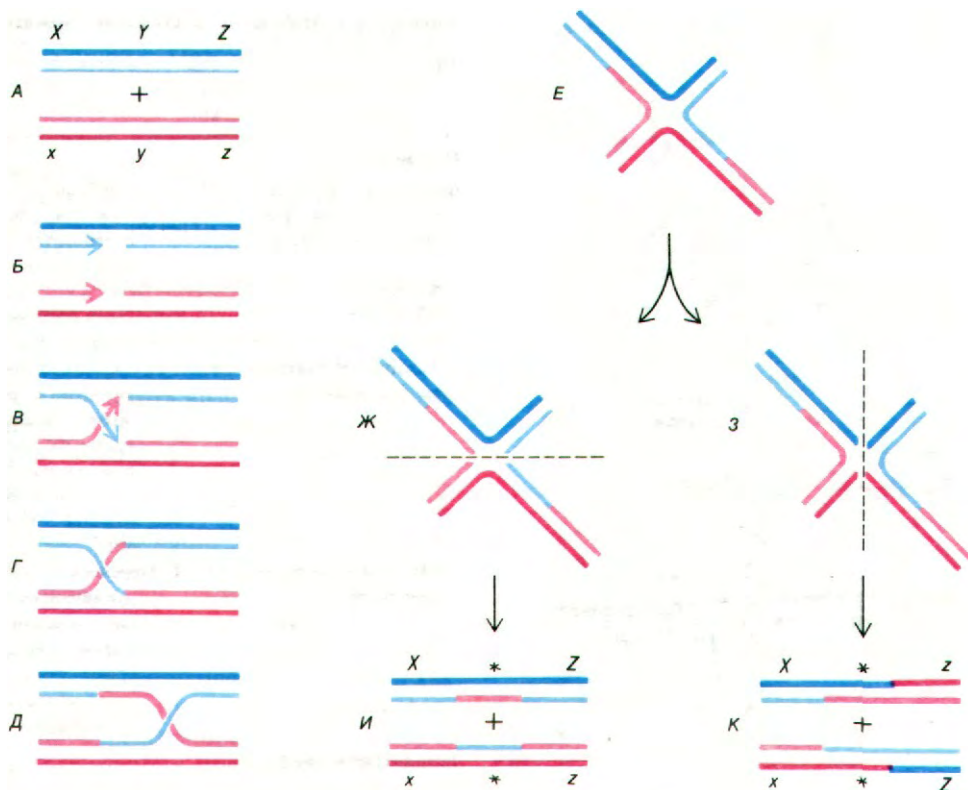


Рис. 31.7. Модель генетической рекомбинации, предложенная Робинном Холидеем (Robin Holliday). Одна из родительских двухцепочечных молекул изображена синим цветом, а другая красным. Более темная нить в каждом дуплексе - (+)цепь. Буквами X, Y и Z обозначены три гена; x, y и z - их аллели. B и Г - ковалентное соединение родительских молекул ДНК. E - иное представление комплекса молекул, изображенного на рис. Д. Обратите внимание, что эта структура на рис. E может быть разрезана по горизонтальной или по вертикальной оси. Воссоединение нитей на рис. Ж и З дает два различных набора рекомбинантов (И и К). Участки, содержащие по одной цепи каждого из родительских дуплексов, отмечены звездочками. [Potter H., Dressier D., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 43, 973 (1979).]

происходят при участии *подвижных генетических элементов* (табл. 31.1). Важный класс подвижных генетических элементов - *плазмиды*. Это кольцевые двухцепочечные молекулы ДНК (рис. 31.9), размер которых колеблется от двух до нескольких сотен тысяч пар оснований (kb). Плазмиды содержат гены, ответственные за инактивирование антибиотиков, метаболизм природных соединений и образование токсинов. В сущности, *плазмиды представляют собой дополнительные хромосомы*. Они отличаются от бактериальной хромосомы тем, что без них в определенных условиях клетка может обойтись. Кроме того, *плазмиды обладают способностью реплицироваться независимо от клеточной хромосомы*. Клетка *E. coli* обычно содержит около 20 копий мелких хромосом и 1-2 большие.

31.5. Фактор F позволяет бактериям передавать гены реципиентам путем конъюгации

Некоторые плазмиды обуславливают перенос бактериями генетического материала

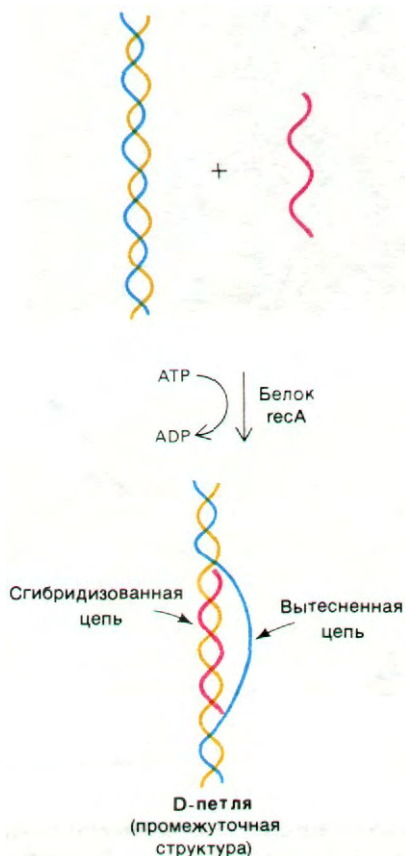


Рис. 31.8. Спаривание одноцепочечной молекулы ДНК (показана красным цветом) с комплементарной цепью (желтым) дуплекса, катализируемое белком гес А. В результате образуется структура, называемая D-петлей.

в другие бактерии путем образования непосредственных межклеточных контактов. Этот процесс, названный *конъюгацией*, открыли в 1946 г. Джошуа Ледерберг и Эдвард Татум (Joshua Lederberg, Edward Tatum). При конъюгации клеток *E. coli* один партнер (мужского пола) служит донором генетического материала, другой (женского пола) - реципиентом. Бактерии мужского пола имеют на поверхности особые отростки, получившие название *половых пилей*, а женские клетки несут рецепторные участки, которые связывают пили. Пиль связы-

Таблица 31.1. Мобильные генетические элементы

Тип	Размер, kb	Свойства
Плазмиды		
Фактор F (фактор фертильности, фактор плодовитости)	93	Сообщает клетке мужской фенотип, переносится при конъюгации
Факторы F'	>100	Переносят, помимо генов фактора F, гены <i>E. coli</i>
Факторы R (факторы устойчивости)	4-117	Содержат гены устойчивости к различным веществам: кроме того, некоторые из них содержат гены, обеспечивающие конъюгацию
Факторы колициногенности	6-141	Переносят гены, продуцирующие колицины (токсин); некоторые содержат, кроме того, гены, обеспечивающие конъюгацию
Лизогенизирующие факторы		
Лямбда	48	Небольшая часть фагов переносит гены <i>E. coli</i> (<i>gal</i> или <i>bio</i>) наряду с вирусными генами
Мю	38	Все фаги мю несут короткий участок генома <i>E. coli</i>
Последовательности-вставки (IS-элементы)	От 0,8 до 1,4	Гены, обрамленные парой IS-элементов, могут переноситься с места на место внутри клетки

вает между собой мужскую и женскую клетки (рис. 31.1). Затем он сокращается, что позволяет клеткам вступить в непосредственный контакт для передачи ДНК (рис. 31.10). Бактерия мужского пола содержит плазмиду, называемую *фактором F* (от англ. fertility - плодовитость), которая несет гены, детерминирующие образование половых пилей и других компонентов, участвующих в конъюгации. При конъюгации одна цепь плазмиды фактора F разрывается в одном месте, и происходит расплетание двухцепочечной молекулы (рис. 31.11). 5'-конец разорванной цепи входит в реципиент-

ную клетку, и на ней синтезируется комплементарная цепь. При этом образуется замкнутая кольцевая двухцепочечная молекула. *Присутствие плазмиды фактора F в реципиентной клетке (первоначально F⁻) превращает ее в мужскую клетку (F⁺)*. Мужская клетка может спонтанно терять свой фактор и ревертировать таким образом к генотипу F⁻.

Плазмида фактор F может интегрироваться с бактериальной хромосомой. Интеграция происходит путем кроссинговера с одним из множества мест в бактериальной хромосоме. Частота интеграции составляет примерно 10^{-5} в расчете на одну генерацию. Бактерии, несущие фактор F в своих хромосомах, называются *клетками Hfr* (от англ. high frequency of recombination - высокая частота рекомбинации). Клетки Hfr, как и клетки F⁺, участвуют в конъюгации в качестве доноров (рис. 31.12). Различие между ними состоит в том, что *клетка Hfr передает всю бактериальную хромосому (включая интегрированный фактор F)*, тогда как клетка F⁺ передает реципиенту только фактор F. При скрещивании Hfr x F⁻ вся хромосома переносится примерно за 90 мин. Порядок входа передаваемых генов в реципиентную клетку зависит от места, в котором произошла интеграция фактора F и от его полярности. Поэтому порядок генов в хромосоме донора можно легко установить, прерывая конъюгацию в различные моменты времени и определяя, какие маркеры успели перейти. Передаваемая хромосома донора может рекомбинировать с хромосомой реципиента. Частота рекомбинации выше всего для генов, которые вошли в реципиентную клетку первыми, так как они находятся там дольше всего. Таким образом, можно строить генетические карты, определяя *время входа и частоту рекомбинации маркеров, передаваемых донором*.

При исключении фактора F из хромосомы Hfr-клетки она переходит в состояние F⁺. Этот процесс, обратный интеграции фактора F, также происходит с частотой примерно 10^{-5} за одну генерацию. В небольшой части ревертантов кроссинговер происходит в сайте, отличном от сайта интеграции. В результате *образуется плазмида, содержащая, помимо генов фактора F, хромосомные гены* (рис. 31.13). Такая плазмида называется *фактором F'*; штрих обозначает, что в ней присутствуют хромосом-

ные гены. Конъюгация клетки F' с клеткой F⁻ приводит к переносу этих хромосомных генов из донора в реципиентную клетку, которая в результате становится диплоидной по этим генам.

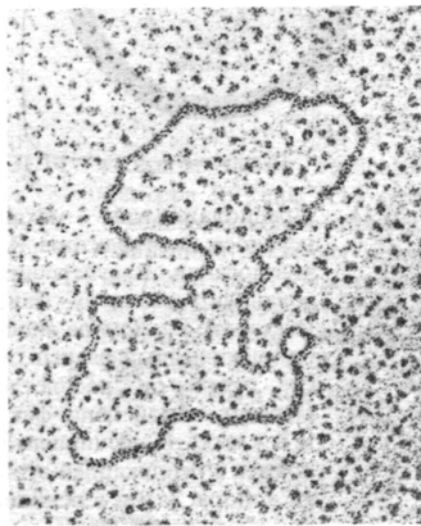


Рис. 31.9. Электронная микрофотография небольшой плазмиды фактора R. (Печатается с любезного разрешения д-ра Jack Griffith.)



Рис. 31.10. Электронная микрофотография двух клеток *E. coli* во время конъюгации. (Печатается с любезного разрешения д-ра Lucien Caro.)

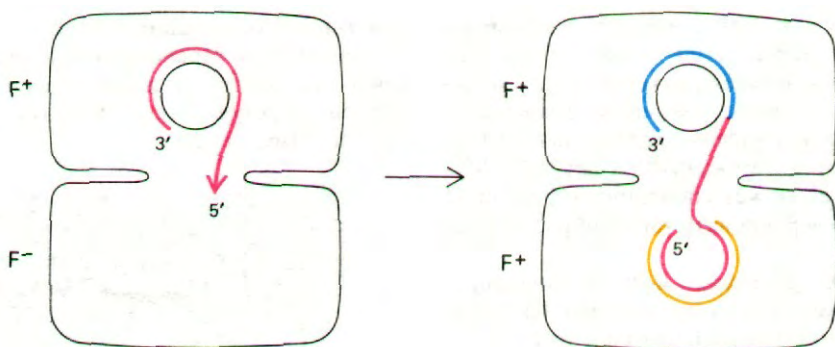


Рис. 31.11. Предполагаемый механизм переноса нити фактора R при конъюгации. В суперспирализованную молекулу фактора R в клетке F^+ -донора вносится одноцепочечный разрыв, и после этого он расплетается. Перенос одной цепи фактора R в клетку F^- -реципиента сопряжен с репликацией этой цепи донора. Затем в реципиентной клетке синтезируется комплементарная цепь. [Warren G.J., Twigg A.J., Sherratt D.J., Nature, 274, 260 (1978).]

Таким образом, у бактерий имеется механизм для переноса целых хромосом или нескольких генов из одной клетки в другую. Фактор F можно рассматривать как особый переносчик (вектор), возникший специально для обмена генетическим материалом. Интересно отметить, что лизогенизирующие фаги также могут участвовать в обмене генов клетки-хозяина. Например, ДНК фага λ может интегрировать между генами gal и bio хромосомы $E. coli$ (разд. 30.16). Исключение профага из хромосомы обычно происходит точно, но не всегда. Примерно в одном вирионе на 10^5 ДНК фага λ содержит оперон gal или ген bio . При заражении такими фагами, называемыми λgal и λbio , эти гены вводятся в клетку $E. coli$ вместе с генами фага λ . Другой родственный фаг, который называется ф80, интегрирует вблизи оперона trp и может переносить гены trp

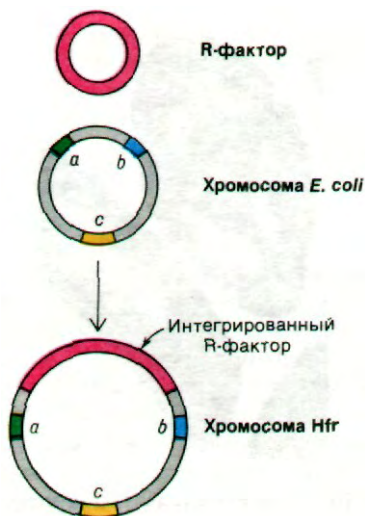


Рис. 31.12. Схема образования Hfr-клеток путем интеграции фактора F с хромосомой $E. coli$.



Рис. 31.13. Аномальное исключение фактора F приводит к образованию плазмиды F' , содержащей часть хромосомы $E. coli$.

из одной зараженной клетки в другую. Бактериофаг μ интегрирует почти в любом месте хромосомы *E. coli* и при исключении всегда захватывает кусок бактериальной хромосомы. Эти *трансдуцирующие фаги*, подобно фактору *F*, представляют собой подвижные генетические элементы, которые обеспечивают взаимообмен бактериальных генов. Не исключено, что трансдукция ускоряет эволюцию бактерий.

31.6. Плазмиды факторы R придают бактериям устойчивость к антибиотикам
Поразительным примером необычно быстрой эволюции бактерий может служить эпидемия бактериальной дизентерии, протекавшая в 1955 г. Один из штаммов *Shigella dysenteriae* приобрел устойчивость одновременно к хлорамфениколу, стрептомицину, сульфаниламидам и тетрациклину. Такого рода множественная устойчивость к лекарственным препаратам в настоящее время широко распространена среди многих патогенных микроорганизмов. Гены, придающие устойчивость к многим антибиотикам, соединены вместе в *плазмидных факторах R* (от англ. resistance - устойчивость), называемых также *факторами устойчивости*. Наиболее крупные из этих плазмид наряду с несколькими генами *r* содержат также фактор переноса устойчивости (resistance transfer factor-RTF) (рис. 31.14). Участок RTF позволяет плазмиде переноситься в другие бактерии с помощью конъюгации. В действительности гены участка RTF весьма сходны с аналогичными генами факторов *F*. Гены *r* кодируют ферменты, инактивирующие определенные лекарственные вещества. Факторы *R*, имеющие участок RTF, могут переноситься между различными видами бактерий при совместном культивировании. Следовательно, *множественная устойчивость к антибиотикам может быть трансмиссивной*.

Маленькие плазмиды факторы *R* лишены области RTF и обычно придают клетке устойчивость только к одному антибиотику. Например, плазмида *R pSC101* длиной 8,2 kb несет ген устойчивости к тетрациклину, но она не может быть перенесена путем конъюгации. Однако этот ген *r* может присоединиться к другой плазмиде, несущей иной ген устойчивости к какому-либо веществу (рис. 31.15). Если эти гены *r* интегрируют с плазмидой, содержащей область RTF, возникает трансмиссивная *R-плазмида*.



Рис. 31.14. Схематическое изображение фактора *R*. Гены *RTF* (ответственные за конъюгацию и репликацию) показаны зеленым цветом, а гены *r* (ответственные за устойчивость к различным лекарственным веществам) — красным. *IS*-элементы показаны желтым цветом.

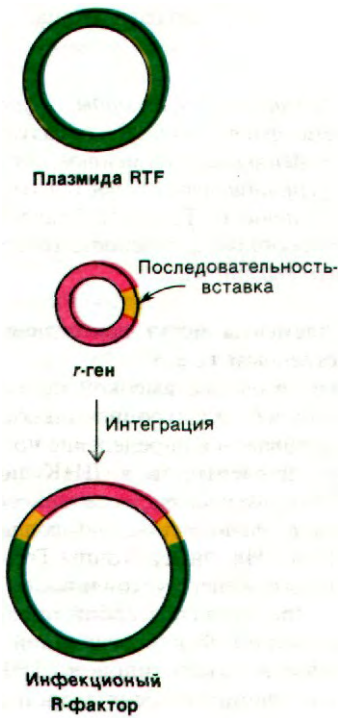


Рис. 31.15. Инфекционный фактор *R* образуется, когда ген *r* присоединяется к плазмиде RTF.

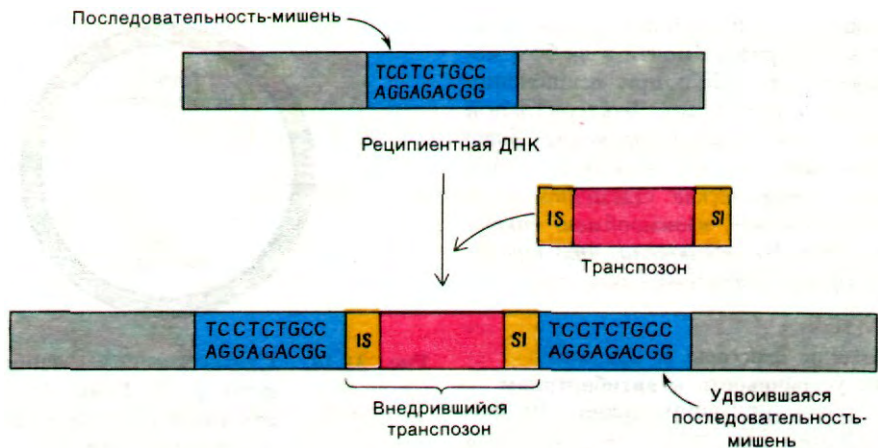


Рис. 31.16. Перенос гена (показано красным цветом), граничащего с обеих сторон с IS-элементами (желтый цвет). При транспозиции реципиентный участок (синий цвет) удваивается. Один конец транспозона представляет собой обращенный повтор другого конца.

да. Следовательно, плазмиды, являющиеся сложными факторами R, образуются из весьма подвижных элементов, обуславливающих, устойчивость к отдельным химическим соединениям. Такие генетические элементы, способные к переносу, теперь называют **транспозонами**.

31.7. IS-элементы могут присоединяться к неродственным генам

Что лежит в основе высокой подвижности транспозонов? Электронно-микроскопические исследования и определение последовательности нуклеотидов в ДНК показали, что *последовательность, расположенная на одном конце транспозона, повторяется на другом конце*. Например, концы Tn3-транспозона, кодирующего устойчивость к ампициллину, - представляют собой обращенные повторы длиной 38 пар оснований. Последовательности нуклеотидов в ДНК реципиенте, граничащие с обеих сторон с транспозоном, являются прямым повтором последовательности 5-9 пар оснований, присутствовавшей до вставки транспозона (рис. 31.16). Между этими обрамляющими

последовательностями реципиентной ДНК и концевыми последовательностями транспозона нет никакой гомологии. Кроме того, гены *rec E. coli* не участвуют в процессе интеграции транспозона, что в корне отличает его от общей генетической рекомбинации. Концы транспозона, возможно, служат IS-элементами, направляя действие нуклеаз и других белков, участвующих в интеграции. Самое главное заключается в том, что *транспозон не обязательно гомологичен реципиентной ДНК, так как специфичность интеграции определяется в первую очередь ДНК-белковыми взаимодействиями, а не спариванием оснований*.

Самые маленькие подвижные генетические элементы - это *последовательности-вставки* (IS-элементы), которые имеют длину около 1 kb. В отличие от транспозонов IS-элементы не несут никаких генов. Однако они оказывают существенное влияние на выражение соседних генов. IS-элементы обычно блокируют транскрипцию дистальных генов транскрипционной единицы. Кроме того, они могут выступать в качестве новых промоторов. К тому же IS-элементы способствуют таким хромосомным перестройкам, как делеции и инверсии. В хромосоме *E. coli* было обнаружено несколько копий четырех различных IS-элементов (IS1, IS2, IS3 и IS4). К тому же концевые последовательности некоторых транспозонов идентичны одному из этих IS-элементов. *По всей вероятности, транспозон образуется в том случае, когда какой-либо ген оказывается окруженным парой IS-элементов*.

Мы уже видели, что плазмиды и фаги могут обмениваться блоками генов с бактериальными хромосомами. Кроме того, плазмиды и фаги способны рекомбиниро-

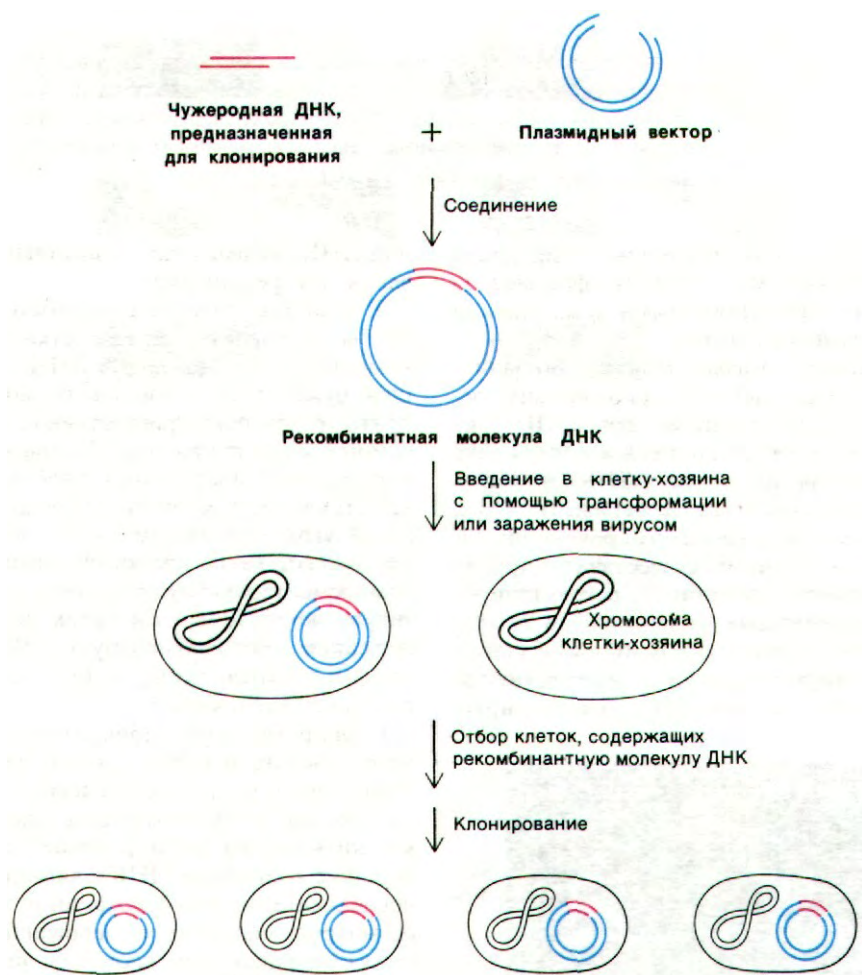


Рис. 31.17. Синтез и клонирование рекомбинантных молекул ДНК.

вать друг с другом. Было показано, что генетический элемент, отвечающий за устойчивость к тетрациклину, перемещается из плазмиды фактора R в фаг, размножающийся в клетках *Salmonella*, а оттуда в хромосому *Salmonella*, затем в фаг λ и из фага λ в *trp*-оперон *E. coli* и обратно в фаг λ . Это замечательное путешествие показывает, насколько подвижны гены прокариот. Было бы интересно выяснить, обладают ли гены эукариот столь же высокой подвижностью.

31.8. В лаборатории можно сконструировать новые геномы и клонировать их в клетках-хозяевах

Разработанная в последние годы технология рекомбинантных ДНК - важнейшее достижение молекулярной биологии. Появи-

лась возможность создать в лабораторных условиях новые комбинации неродственных генов. Затем эти новые геномы можно ввести в подходящие клетки и размножить во много раз с помощью механизмов синтеза ДНК клетки-хозяина. Некоторые из таких введенных в клетки генов могут также транскрибироваться и транслироваться в новом окружении. Основные этапы клонирования ДНК сводятся к следующему (рис. 31.17).

1. *Создание рекомбинантной молекулы.* Интересующий исследователя фрагмент ДНК ковалентно присоединяется к ДНК вектора. Основное свойство вектора состоит в том, что он может автономно реплицироваться в подходящем хозяине. Например, плазмиды и фаг λ наиболее удобные векторы для клонирования генов в клетках *E. coli*. Как будет описано ниже, молекулы

Химерная ДНК -

рекомбинантная молекула ДНК, содержащая неродственные гены. От слова химера - мифологическое существо с головой льва, телом козла и хвостом змеи. «...Коей порода была от богов, не от смертных: Лев головою, задом дракон и коза серединой, Страшно дышала она пожирающим пламенем бурным». Гомер, «Илиада», пер. Н. Гнедича, гл. VI, стих 180.

ДНК можно соединить путем лигирования (т.е. воздействием лигазы) фрагментов с липкими одноцепочечными концами или же с тупыми концами.

2. *Введение в клетку-хозяина.* Большинство бактериальных и эукариотических клеток поглощает голые молекулы ДНК из среды. Эффективность поглощения низка (примерно 1 на 10^6 молекул ДНК), но в специально подобранных экспериментальных условиях можно трансформировать значительную часть клеток. Существует и другой метод: клетки заражают реконструированными вирионами, содержащими рекомбинантные молекулы ДНК. В таком синтетическом вирусном геноме интересующий исследователя ген замещает участок вирус-

ной ДНК, не имеющий существенного значения для репликации.

3. *Отбор.* Следующий этап состоит в том, чтобы определить, какие клетки несут рекомбинантную молекулу ДНК, содержащую нужный ген. Такие клоны можно отобрать по признаку присутствия вектора или самого встроенного гена. Например, некоторые плазмидные векторы сообщают клетке устойчивость к какому-либо антибиотику. Другой подход состоит в том, чтобы определить, какие клетки связывают РНК, комплементарную нужному гену, или синтезируют кодируемый им белок. Клоны, содержащие рекомбинантную ДНК, стабильны, по крайней мере в течение нескольких сотен поколений.

Клонирование рекомбинантной ДНК уже внесло большой вклад в наши представления о структуре хромосомы и выражении гена. Многие встроенные гены удалось размножить путем клонирования, что дало большие количества ДНК для определения последовательности оснований и электронно-микроскопических исследований. Кроме того, с помощью этих клонов были синтезированы в больших количествах белки, которые в обычных условиях образуются в ничтожных количествах. Методы рекомбинантных ДНК используются также для изучения сложных геномов и регуляции их выражения.

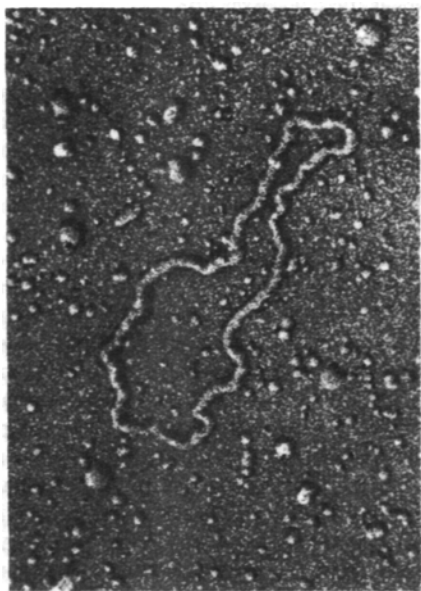


Рис. 31.18. Электронная микрофотография pSC101 - плазмидного вектора, использованного для клонирования ДНК. (Печатается с любезного разрешения д-ра Stanley Cohen.)

31.9. Ферменты рестрикции и ДНК-лигаза - необходимые инструменты для получения рекомбинантных молекул ДНК

Молекулы ДНК можно легко соединять *in vitro* с помощью рестриктирующих эндонуклеаз (разд. 24.27), ДНК-лигаз (разд. 24.15) и других высокоспецифических ферментов, действующих на ДНК. В эксперименте по получению рекомбинантной ДНК вектор подготавливают к соединению с клонируемым фрагментом путем расщепления в одном определенном месте с помощью рестрикционной эндонуклеазы. Например, небольшую плазмиду pSC101 можно расщепить в одном месте ферментом рестрикции EcoRI. Если с помощью этого фермента две



Рис. 31.19. Соединение молекул ДНК с помощью метода липких концов. Одна из родительских молекул ДНК (показано зеленым цветом) несет гены *P* и *Q*, разделенные участком рестрикции, а другая (красный цвет) несет гены *X* и *Y*. Одна из рекомбинантных молекул несет гены *P* и *Y*, а другая - *Q* и *X*.

к тетрациклину. Затем используют другой метод отбора для выявления клонов, содержащих плазмиду со встроенной ДНК.

Второй метод соединения двух неродственных молекул ДНК основан на присоединении poly(dA)-фрагментов к обоим 3'-концам одной молекулы и poly(dT)-фрагментов к обоим 3'-концам другой молекулы (рис. 31.20). Эти гомополимерные последовательности синтезируются *терминальной*

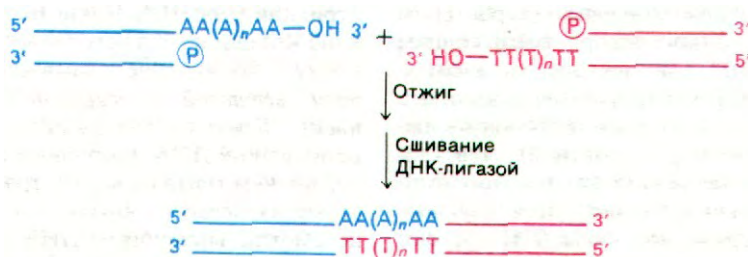


Рис. 31.20. Соединение молекул ДНК с помощью наращивания poly(dA)- и poly(dT)-концов (коннекторным методом).

цепи ДНК расщепить наискосок, то образуются *комплементарные одноцепочечные концы (липкие концы)*. Предположим теперь, что фрагмент ДНК, который необходимо ввести в эту плазмиду, образован путем расщепления большой молекулы ДНК эндонуклеазой *EcoRI*. Тогда одноцепочечные концы этого фрагмента будут комплементарны концам расщепленной плазмиды. Теперь фрагмент ДНК и плазмиду можно подвергнуть отжигу и соединить ДНК-лигазой (рис. 31.19). Затем бактерии инкубируют в присутствии этой смеси молекул ДНК. Небольшую часть бактерий, несущих плазмиду, отбирают, исходя из того что pSC101 сообщает клеткам устойчивость

дезоксинуклеотидил-трансферазой (*терминальной трансферазой*) - ферментом, присоединяющим нуклеотиды к 3'-гидроксильной группе цепи ДНК. Эта трансфераза в отличие от ДНК-полимеразы не зависит от матрицы, поэтому с ее помощью можно присоединить последовательности из нуклеотидов только одного типа (обычно длиной 100 остатков). *Poly(dA)*-концы одной молекулы ДНК отжигают с *poly(dT)*-концами другой. Длины этих концевых последовательностей могут несколько колебаться, поэтому, прежде чем соединить цепи ДНК-лигазой, бреши заполняют с помощью ДНК-полимеразы I. Точно так же можно использовать для соединения различных молекул ДНК и концевые *poly(dG)*- и *poly(dC)*-последовательности.

Третий подход к соединению молекул

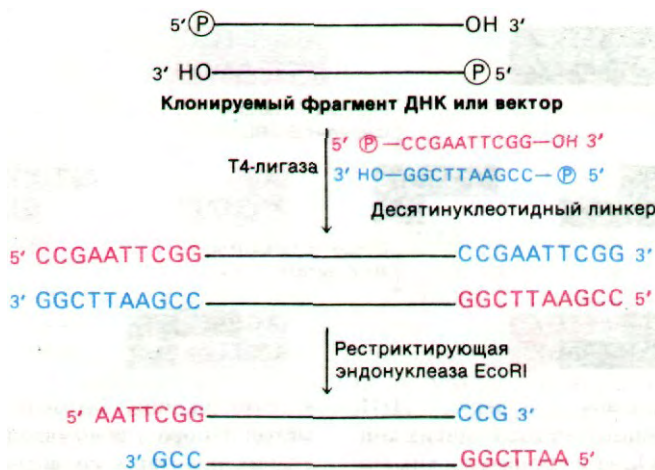


Рис. 31.21. Образование липких концов путем присоединения и расщепления химически синтезированного линкера.

ДНК сочетает преимущества метода липких концов с универсальным характером (dA—dT)-метода (коннекторного). К концам фрагмента ДНК или вектора ковалентно присоединяют химически синтезированный линкер, т.е. связующую цепь (длиной от шести до десяти пар оснований), чувствительный к расщеплению каким-либо ферментом рестрикции. 5'-концы десяти-нуклеотидного линкера и молекулы ДНК фосфорилируют полинуклеотидкиназой и соединяют лигазой фага Т4, которая может образовывать ковалентную связь между молекулами ДНК с тупыми концами. Если обработать эти концевые участки соответствующим ферментом рестрикции, образуются липкие концы (рис. 31.21). Таким образом, почти у любой молекулы ДНК можно вызвать образование липких концов, соответствующих специфичности данного фермента рестрикции.

31.10. Плазмиды и фаг лямбда - наиболее подходящие векторы для клонирования ДНК в бактериях

Для увеличения эффективности проникновения рекомбинантных ДНК в клетку и облегчения отбора содержащих такие молекулы бактерий создаются новые векторы. Например, плаزمида pBR322 содержит гены

устойчивости к тетрациклину и ампициллину (сходный с пенициллином антибиотик). Эту плазмиду пять различных рестриктаз расщепляют в каком-то одном определенном месте каждая (рис. 31.22). Введение ДНК в участок рестрикции EcoRI не затрагивает генов устойчивости к антибиотикам. В то же время введение ДНК в участки рестрикции HindIII, SalI или BamHI приводит к инактивации гена устойчивости к тетрациклину; это явление называется *инактивацией вставкой (инсерционной инактивацией)*. Клетки, содержащие pBR322 со вставленной ДНК, устойчивы к ампициллину, но чувствительны к тетрациклину; поэтому их легко отобрать. Клетки, которые не смогли воспринять ДНК вектора, чувствительны к обоим антибиотикам, а клетки, содержащие pBR322 без вставки ДНК, к обоим антибиотикам устойчивы.

Другая группа векторов создана на основе плазмиды ColE1, кодирующей колицин Е - белковый токсин, убивающий некоторые штаммы *E. coli*. Преимущество использования этих *колициногенных плазмид* в качестве

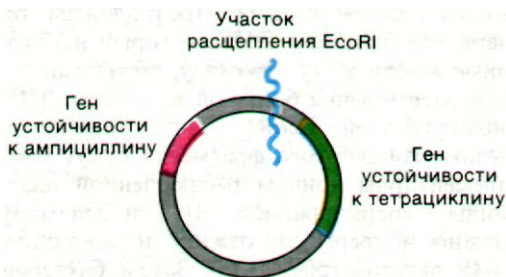


Рис. 31.22. Генетическая карта плазмиды pBR322, несущей два гена устойчивости к антибиотикам.

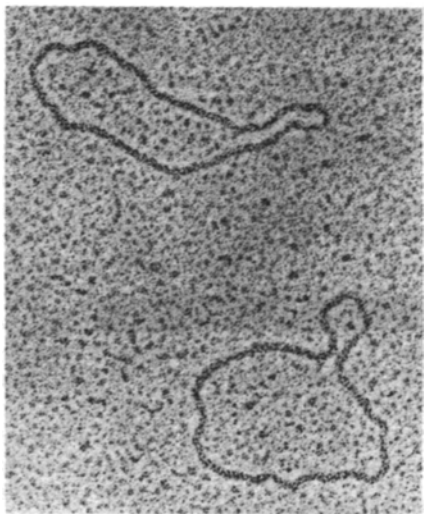


Рис. 31.23. Электронная микрофотография плазмид ColE1. (Печатается с любезного разрешения д-ра Jack Griffith.)

векторов состоит в том, что их репликация не находится под строгим контролем. В клетке, содержащей ColE1, обычно имеется 25 копий плазмиды. Обработка клеток хлорамфениколом блокирует синтез белка и репликацию клеточной хромосомы. Однако репликация ColE1 в этих условиях продолжается. В результате в клетках, обработанных хлорамфениколом, может накапливаться 1000 копий ColE1, так что количество этой плазмиды достигает примерно половины всей клеточной ДНК¹.

Фаг λ - другой удобный вектор. Большие участки его ДНК, имеющей в длину 48 kb, не являются необходимыми для литической инфекции или интеграции и могут быть замещены чужеродной ДНК. Были сконструированы мутантные фаги λ , предназначенные для клонирования ДНК. Один из этих мутантов, который называется λ gt¹⁰, содержит два участка расщепления EcoRI вместо пяти, имеющих в фаге дикого типа (рис. 31.24). После расщепления центральный участок молекулы ДНК этого фага λ можно удалить. Два оставшихся куска ДНК составляют вместе 72% длины всего генома. Это количество ДНК недостаточно

для упаковки в головку фага λ . Длина ДНК, которая может быть легко упакована в головку, достигает 75-105% длины генома дикого типа. Однако *достаточно длинный фрагмент ДНК (скажем, длиной 10 kb), вставленный между двумя концами ДНК фага λ , позволяет такой рекомбинантной молекуле ДНК (93% генома) быть упакованной в головку (инкапсидироваться)*. Почти все инфекционные частицы λ , образованные таким способом, будут содержать вставленный кусок чужеродной ДНК. Еще одно преимущество использования этих вирионов в качестве векторов состоит в том, что они проникают в бактерии с гораздо более высокой эффективностью, чем плазмиды. К настоящему времени разработаны методы упаковки молекул ДНК *in vitro* с образованием инфекционных вирионов λ . Для использования в качестве векторов были сконструированы самые разнообразные мутанты фага λ . Некоторые из них могут служить векторами для вставок фрагментов ДНК, достигающих 40 kb.

31.11. Из суммарной геномной ДНК, расщепленной рестриктирующими эндонуклеазами, можно выделить с помощью клонирования определенные эукариотические гены

Как уже говорилось в предыдущей главе, исследование эукариотических геномов представляет огромные трудности. Ген длиной 1 kb составляет $2,5 \cdot 10^{-4}$ генома *E. coli* и всего лишь $3,4 \cdot 10^{-7}$ генома млекопитающих. Методы рекомбинантных ДНК позволяют в настоящее время вводить эукариотический ген в *E. coli*, что сильно упрощает задачу. Эксперимент начинается с частичного расщепления ДНК эукариотического генома, чтобы получить случайные фрагменты средней длиной примерно 20 kb (рис. 31.25). К концам этих фрагментов присоединяют синтетические линкеры, образуют липкие концы и затем присоединяют к какому-нибудь вектору, например к ДНК фага λ . При упаковке ДНК в вирионы *in vitro* происходит отбор рекомбинантных молекул ДНК, содержащих большие вставки. Затем этими рекомбинантными фагами заражают клетки *E. coli*. Получается лизат, содержащий фрагменты эукариотической ДНК, заключенной в фаги и размноженной примерно в миллион раз. Этот лизат представляет собой би-

¹ Плазмида pBR322 создана на основе ColE1, поэтому она обладает способностью точно так же накапливаться в клетках в присутствии хлорамфеникола. - Прим. перев.

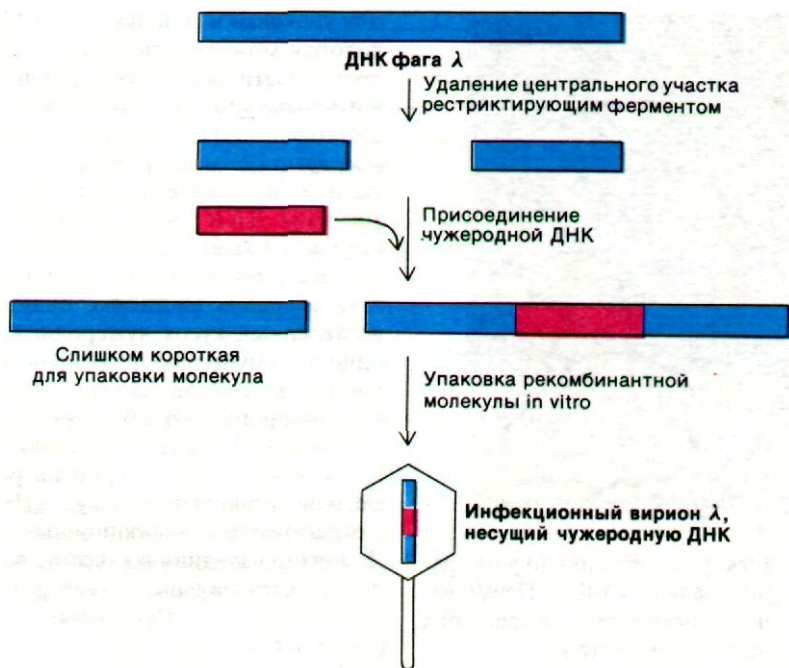


Рис. 31.24. В качестве вектора для клонирования может быть использован мутант фага λ . В ходе реакции упаковки фага происходит отбор молекул ДНК, содержащих вставку.

библиотеку клонированной эукариотической ДНК.

Затем в такой библиотеке можно провести отбор для идентификации фаговых клонов, содержащих нужный эукариотический ген. Вычисление показывает, что лишь один из 180000 клонов будет содержать уникальный эукариотический ген. Поэтому необходима очень быстрая и эффективная процедура отбора. Она основана на гибридизации. *Присутствие определенной последовательности ДНК в одной бляшке фага λ можно выявить с помощью радиоактивной молекулы комплементарной ДНК или РНК в качестве гибридизационной пробы. Связывание этой пробы можно обнаружить методом радиоавтографии.* Таким образом, можно проверить 1 млн. клонов за один день. Итак, клон, соответствующий определенному эукариотическому гену, можно легко идентифицировать и выделить при условии, что имеется транскрибированная с него РНК в более или менее чистом виде.

31.12. Эукариотические гены могут транскрибироваться в бактериальных клетках

Рекомбинантные молекулы ДНК, содержащие бактериальные гены, часто экспрессируются в клетках *E. coli*. Например, клонирование триптофанового оперона *E. coli* в составе плазмидного вектора ColE1 приводит к образованию больших количеств пяти биосинтетических ферментов, закодированных в этом опероне. Количество этих ферментов примерно в 20 раз выше, чем в обычной клетке *E. coli*, так как рекомбинантная плаزمида представлена многими копиями. ДНК дрожжей, простого эукариотического организма, также может экспрессироваться в бактериях. В одном исследовании в качестве клетки-хозяина использовали мутант *E. coli*, нуждающийся в гистидине, так как он не содержал имидазолглицеролфосфат-дегидрогеназы. При заражении этого мутанта фагом λ , содержащим фрагмент дрожжевой ДНК, появилось несколько бактериальных клонов, которые уже не нуждались в экзогенном гистидине. Вставленный кусок дрожжевой ДНК нес недостающий ген, который экспрессировался с помощью механизмов транскрипции и трансляции бактериальной клетки.

Могут ли гены млекопитающих экспрессироваться в бактериях? Для ответа на этот вопрос в клетки *E. coli* ввели ген инсулина крысы (рис. 31.26). Отправной точкой этого

кДНК -

комплементарная ДНК, синтезированная обратной транскриптазой на РНК-матрице.

исследования послужила инсулинома - опухоль поджелудочной железы, выделяющая большое количество инсулина. Эта опухоль богата мРНК препроинсулина, предшественника активного гормона (разд. 35.9). С помощью обратной транскрипции этой мРНК была получена двухцепочечная комплементарная ДНК (кДНК), а затем ее включили в плазмидный вектор. Почему именно кДНК, а не геномную ДНК ввели в *E. coli*? Как мы уже говорили, многие эукариотические гены содержат вставочные последовательности, которые вырезаются из первичных транскриптов (разд. 29.16). Поскольку бактерии, по всей вероятности, не способны удалять эти последовательности, представляется желательным трансформировать их участком ДНК, комплементарным зрелой мРНК. Действительно, оказалось, что несколько бактериальных клонов, трансформированных инсулиновой кДНК, синтезируют небольшое количество предшественника инсулина (около 100 копий на клетку). Недавно был получен еще один важный результат: последовательность ДНК, кодирующая овальбумин куриного яйца, экспрессируется в клетках *E. coli*. Около 1,5% белка, синтезированного в таких трансформированных бактериях, представляет собой полные молекулы овальбумина (масса 43 кДа). Очевидно, гены эукариотических белков могут экспрессироваться в бактериях.

31.13. Химически синтезированный ген пептидного гормона соматостатина экспрессируется в клетках *E. coli*

Последние достижения в химическом синтезе заданных последовательностей ДНК расширили масштаб и возможности метода рекомбинантных ДНК. Можно синтезировать *de novo* гены с практически любой нуклеотидной последовательностью и вставить их в вектор для введения в *E. coli*. Прекрасным примером такого подхода служит синтез гена *соматостатина* - 14-членного пептида (рис. 31.27), который обнаруживается в экстрактах гипоталамуса. Соматостатин подавляет секрецию гормона роста, инсулина и глюкагона. Молекулу ДНК, кодирующую этот пептид, синтезировали путем соединения восьми олигонуклеотидных блоков. Этот ген соединили с геном β -галактози-

дазы, локализованном в плазмидном векторе. При трансформации *E. coli* начался синтез гибридного белка, в котором соматостатин был присоединен к β -галактозидазе. Пептидную связь между этими двумя компонентами расщепляли *in vitro* с помощью бромциана (разд. 2.7). Для этого встроенный ген содержал кодон метиони-

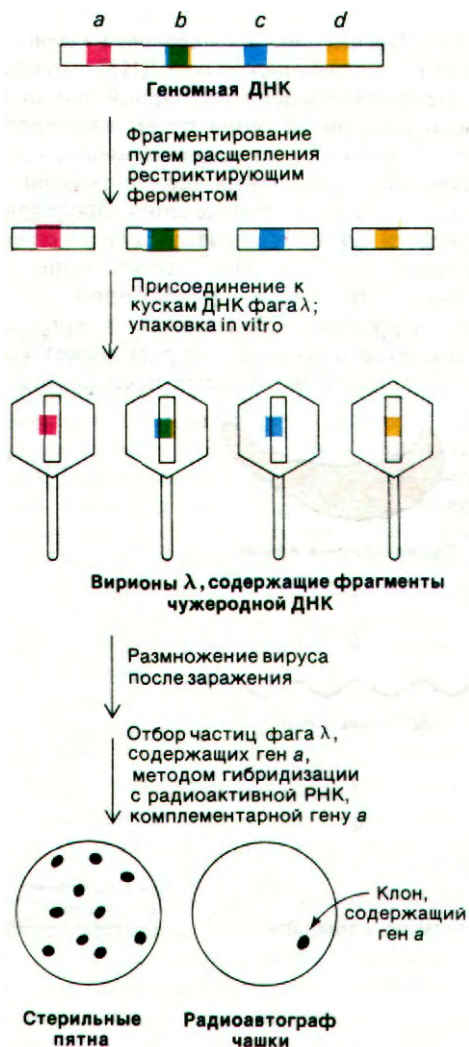


Рис. 31.25. Стратегия клонирования определенного эукариотического гена, начиная с расщепления суммарной геномной ДНК.

на перед первым кодоном соматостатина. С-конец соматостатина был свободен, так как после кодона последнего остатка пептида были расположены два стоп-кодона (рис. 31.27). На долю химерного белка приходилась значительная часть клеточного белка (около 3%). Более того, полученный таким способом соматостатин обладал биологической активностью. *Следовательно, клонированием химически синтезированного гена можно получать функционально активный полипептид.*

31.14. Перспективы клонирования генов

Метод рекомбинантных ДНК открыл новые горизонты в молекулярной биологии. Увеличение числа генов путем клонирования в бактериях дает неограниченные количества ДНК для электронно-микроскопического анализа и определения последовательности нуклеотидов. Исследуются специфические участки ДНК, отвечающие за подвижность генов, репликацию ДНК и транскрипцию. Возникают совершенно новые направления; примером может служить открытие вставочных последователь-

ностей во многих эукариотических генах. Появилась возможность быстро картировать сложные хромосомы и разделять их на отдельные элементы, которые поддаются различным манипуляциям. Темпы исследований постоянно нарастают. Кроме того, клонирование генов становится важным способом получения определенных белков в больших количествах. Например, с помощью рекомбинантных молекул можно увеличить в 500 раз количество ДНК-лигазы, образующейся в клетках *E. coli*. Наиболее многообещающим представляется синтез пептидов и белков эукариот трансформированными бактериями. В недалеком будущем такие гормоны, как инсулин, и такие противовирусные агенты, как интерферон, будут продуцироваться бактериями¹. В фармакологии начинается новая эра, которая, по-видимому, окажет глубокое воздействие на медицину. Исследуются также возможности клонирования генов для увеличения сельскохозяйственного производства. Эукариотические гены вводят в настоящее время не только в бактерии, но и в эукариотические клетки. Например, вирус SV-40 был использован в качестве вектора для переноса гена глобина кролика в клетки почек обезьяны. Такие зараженные клетки синтезировали значительные количества β -глобина кролика. Этот экспериментальный подход является многообещающим методом расшифровки регуляторных механизмов экспрессии эукариотических генов.

Закключение

При генетической рекомбинации новая молекула ДНК образуется путем разрыва и воссоединения цепей ДНК. Взаимообмен

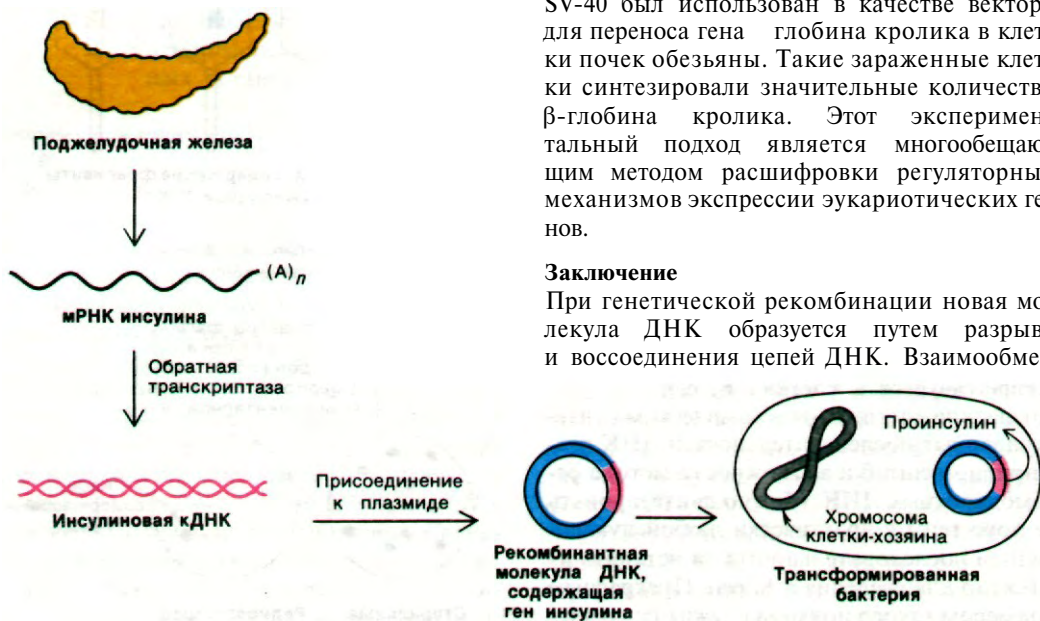


Рис. 31.26. Синтез предшественника инсулина - проинсулина в трансформированных клетках *E. coli*.

может произойти между любой парой гомологичных последовательностей родительских молекул ДНК, и потому этот процесс называется общей генетической рекомбинацией. У *E. coli* общая рекомбинация осу-

¹ В Англии и США уже продается инсулин, синтезированный клетками бактерий.- *Прим. перев.*

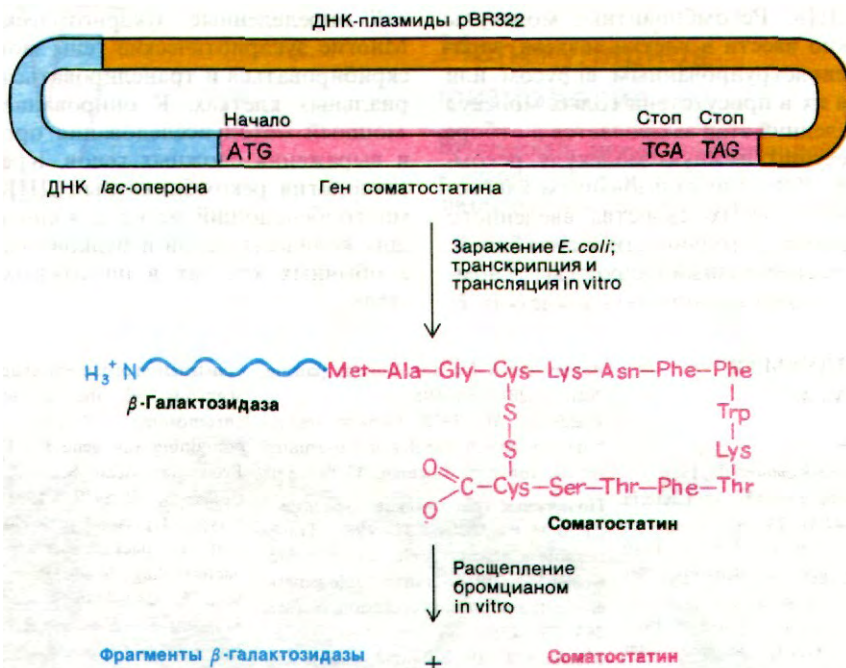


Рис. 31.27. Синтез пептидного гормона соматостатина клетками *E. coli*, трансформированными химически синтезированным геном.

шествляется под действием генов *res*. Белок *resBC* - нуклеаза; она образует одноцепочечную ДНК, которая может внедряться в двухцепочечную молекулу ДНК. Эта реакция связывания одноцепочечной молекулы катализируется белком *resA*, который одновременно гидролизует АТФ.

В генетических перестройках негомологичных локусов участвуют подвижные генетические элементы, называемые транспозонами (элементы, способные к переносу-транспозиции). Плазмиды (небольшие кольцевые двухцепочечные ДНК) - важный класс подвижных генетических элементов. Эти дополнительные хромосомы несут гены, отвечающие за инактивацию антибиотиков, метаболизм природных соединений и образование токсинов. Плазмиды могут реплицироваться автономно или интегрироваться с хромосомой клетки-хозяина. Фактор F (фактор плодovitости) - плазмид, сообщающая бактериям способность передавать гены другим бактериям путем конъюгации. Для конъюгации необходим непосредственный физический контакт между донорной (F^+) и реципиентной (F^-) клетками. Плазмиды факторы R обеспечивают устой-

чивость к антибиотикам. Более крупные из этих плазмид содержат фактор переноса устойчивости (RTF), обуславливающий переход плазмиды в другую бактерию при конъюгации. Некоторые гены, обеспечивающие устойчивость к антибиотикам, могут быть сцеплены с областью RTF. Поэтому множественная устойчивость к лекарственным средствам может быть трансмиссивной. Транспозоны обладают высокой подвижностью, так как они обрамлены IS-элементами. Эти концевые последовательности направляют действие белков, участвующих в их интеграции с ДНК. Транспозон не обязательно гомологичен реципиентной ДНК.

В лаборатории можно создать новые сочетания неродственных генов и клонировать их в клетках-хозяевах. Прежде всего синтезируется рекомбинантная молекула ДНК путем соединения какого-либо фрагмента ДНК с ДНК вектора, который может автономно реплицироваться в подходящем хозяине. Наиболее подходящие векторы - фаг лямбда, вирус SV-40 и плазмиды. Ферменты рестрикции и ДНК-лигаза - основные инструменты для получения новых молекул ДНК. Липкие концы, гомополимерные концевые фрагменты и химически синтезированные линкеры - три способа соединения

молекул ДНК. Рекombинантные молекулы ДНК можно ввести в клетки-хозяева, заражая их реконструированным вирусом или инкубируя их в присутствии голых молекул ДНК. Последний этап заключается в отборе клеток, несущих нужную молекулу рекombинантной ДНК, с использованием какого-либо отличительного свойства введенного гена (например, устойчивости к антибиотикам). Имея рестриктазный гидролизат геномной ДНК, можно клонировать в клетках *E.*

coli определенные эукариотические гены. Многие эукариотические гены могут транскрибироваться и транслироваться в бактериальных клетках. Клонирование генов — мощный метод исследования организации и выражения сложных генов. Кроме того, технология рекombинантных ДНК — весьма многообещающий метод для синтеза больших количеств генов и белков, имеющих в обычных клетках в ничтожных количествах.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Gilbert W., Villa-Komaroff L., 1980. Useful proteins from recombinant bacteria, Sci. Amer., **242**(4), 74-94.
Cohen S.N., Shapiro J.A., 1980. Transposable genetic elements, Sci. Amer., **242**(2), 40-49.
Abelson J., Butz E. (eds.), 1980. Recombinant DNA, Science, **209**, 1317-1438. (Этот весьма содержательный выпуск журнала Science содержит много прекрасных статей, посвященных структуре и изменениям генов эукариот и экспрессии клонированных генов.)
Clowes R.C., 1973. The molecule of infectious drug resistance, Sci. Amer., **228**(4), 18-27.
Cohen S.N., 1975. The manipulation of genes, Sci. Amer., **233**(1), 24-33. (Эта и некоторые другие статьи, посвященные той же проблеме, помещены в книге Freifelder D. (ed.), Recombinant DNA, Freeman, 1978.)
Stanier R.Y., Adelberg E.A., Ingraham J.L., 1976. The Microbial World (4 th ed.), Prentice-Hall. (Особенно удачна гл. 15, посвященная рекombинации, конъюгации и трансдукции.)

Генетическая рекombинация

Stahl F.W., 1979. Genetic Recombination, Freeman.
Potter H., Dressler D., 1978. In vitro system from *Escherichia coli* that catalyzes generalized genetic recombination, Proc. Nat. Acad. Sci., **75**, 3698-3702.
McEntee K., Weinstock G.M., Lehman I.R., 1979. Initiation of general recombination catalyzed in vitro by the recA protein of *E. coli*, Proc. Nat. Acad. Sci., **76**, 2615-2619.
Cunningham R.P., Shibata T., Gasgusta C., Radding C.M., 1979. Single strands induce recA protein to unwind

duplex DNA for homologous pairing, Nature, **281**, 191-195.

Radding C.M., 1978. Genetic recombination: strand transfer and mismatch repair, Ann. Rev. Biochem., **47**, 847-880.

Подвижные генетические элементы

Calos M.P., Miller J.H., 1980. Transposable elements, Cell, **20**, 579-595.
Cohen S.N., 1976. Transposable genetic elements and plasmid evolution, Nature, **263**, 731-738.
Kleckner N., 1977. Translocatable elements in procaryotes, Cell, **11**, 11-23.
Hicks J., Strathern J.N., Klar A.J.S., 1979. Transposable mating type genes in *Saccharomyces cerevisiae*, Nature, **282**, 478-483.

Gill R.E., Heffron F., Falkow S., 1979. Identification of the protein encoded by the transposable element Tn3 which is required for its transposition, Nature, **282**, 797-801.

Chou J., Lemaux P.G., Casadaban M.J., Cohen S.N., 1979. Transposition protein of Tn3: identification and characterisation of an essential repressor-controlled gene product, Nature, **282**, 801-806.

Bukhari A.I., Shapiro J.A., Adhya S.L. (eds.), 1977. DNA Insertion Elements and Episomes, Cold Spring Harbor Laboratory.

Broda P., 1979. Plasmids, Freeman. [Брода П. Плазмиды. — М.: Мир, 1982.]

Конструирование и клонирование рекombинантных генов

Setlow J.K., Hollaender A. (eds.), 1979. Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum.

Scott W.A., Werner R., 1977. Molecular Cloning of Recombinant DNA, Academic Press.

Helinski D.R., 1978. Plasmids as vehicles for gene cloning: impact on basic and applied research, Trends Biochem. Sci., **3**, 10-14.

Cameron J.R., Panesenko S.M., Lehman I.R., Davis R.W., 1975. In vivo

construction of bacteriophage λ carrying segments of the *Escherichia coli* chromosome: selection of hybrids containing the gene for DNA ligase, Proc. Nat. Acad. Sci., **72**, 3416-3420.
Collins J., Hohn B., 1978. Cosmids: a type of plasmid gene-cloning vector that is packable in vitro in bacteriophage heads, Proc. Nat. Acad. Sci., **75**, 4242-4246.

Maniatis T., Hardison R.C., Lacy E., Lauer J., O'Connell C., Quon D., Sim G.K., Efstratiadis A., 1978. The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA, Cell, **15**, 687-701.

Экспрессия клонированных генов

Villa-Komaroff L., Efstratiadis A., Broome S., Lomedico P., Tizard R., Naber S.P., Chick W.L., Gilbert W., 1978. A bacterial clone synthesizing proinsulin, Proc. Nat. Acad. Sci., **75**, 3727-3731.

Burrell C.J., Mackory P., Greenaway P.J., Hofschneider P.H., Murray K., 1979. Expression in *Escherichia coli* of hepatitis B virus DNA sequences cloned in plasmid pBR322, Nature, **279**, 43-47.

Mulligan R.C., Howard B.H., Berg P., 1979. Synthesis of rabbit β -globin in cultured monkey kidney cells following infection with a SV40 β -globin recombinant genome, Nature, **277**, 108-114.

Химический синтез генов

Khorana H.G., 1979. Total synthesis of a gene, Science, **203**, 614-625.

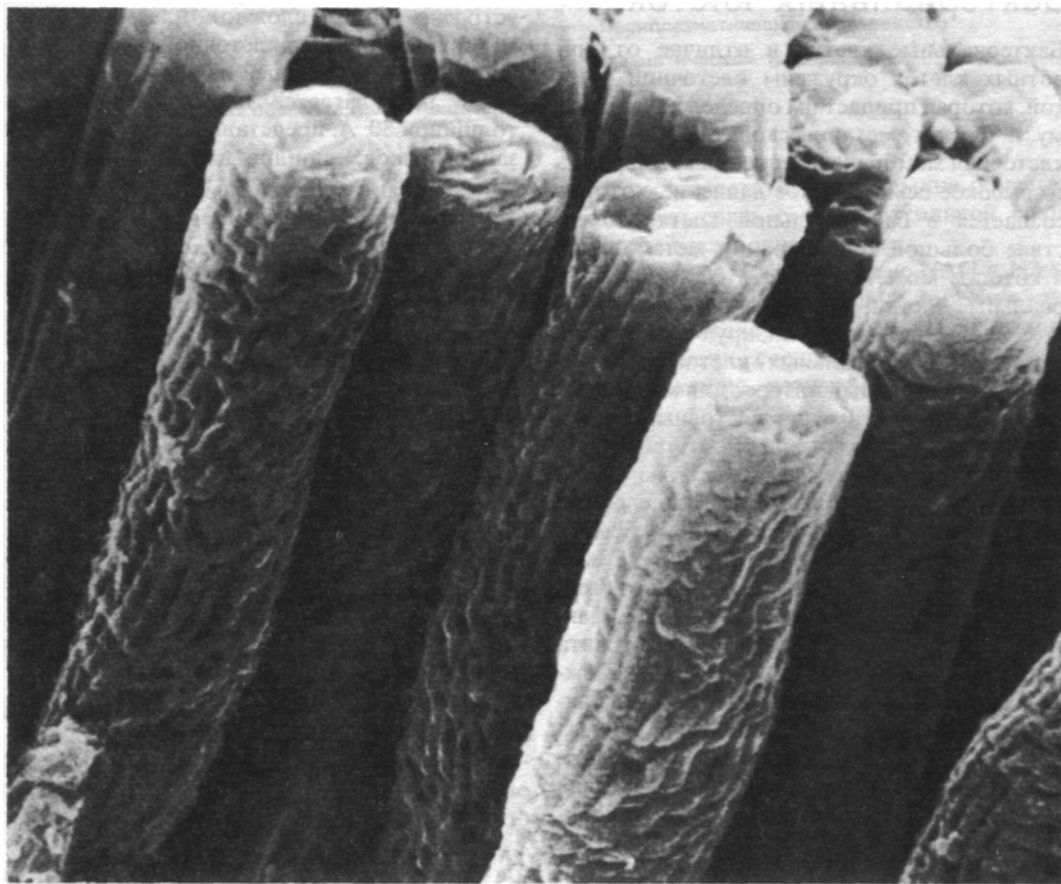
Itakura K., Hirose T., Crea R., Riggs A.D., Heyneker H.L., Bolivar F., Boyer H.W., 1977. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin, Science, **198**, 1056-1063.
Crea R., Kraszewski A., Hirose T., Itakura K., 1978. Chemical synthesis of genes for human insulin, Proc. Nat. Acad. Sci., **75**, 5765-5769.

В

Часть

Молекулярная физиология

Взаимосвязь между информацией,
конформацией и метаболизмом в
физиологических условиях



Микрофотография палочек
сетчатки, полученная с по-
мощью сканирующего микро-
скопа. Для возбуждения палоч-
ки достаточно одного фотона.
(Печатается с любезного разре-
шения д-ра Deric Bownds.)

ГЛАВА 32

Оболочки

бактериальных клеток

Бактериальные клетки в отличие от животных клеток окружены клеточной стенкой, которая придает им определенную форму и служит механической опорой. Одна клеточная мембрана не способна выдержать то высокое осмотическое давление, которое создается в бактериальной клетке вследствие большой концентрации метаболитов и которое может достигать 20 атм. Бактериальные клетки, лишенные клеточных стенок, в обычной среде лизируются.

Стенки бактериальных клеток представляют значительный интерес для медицины. Дело в том, что именно клеточные стенки и связанные с ними вещества определяют *вирулентность бактерий*. Так, введением экспериментальным животным выделенных бактериальных клеточных стенок удается воспроизвести симптомы многих микробных заболеваний. На клеточных стенках находятся *специфические антигены* бактерий. Введением животному экстракта клеточных стенок некоторых бактерий можно выработать у него иммунитет к этим бактериям. Наконец, при подавлении синтеза клеточных стенок бактерии погибают. Именно на этом основан механизм действия *пенициллина* и некоторых других антибиотиков.

Уже более полувека бактерии классифицируют на грам-положительные и грам-отрицательные в зависимости от их реакции на окраску по Граму. Основа этого эмпирически найденного различия стала теперь понятной. Указанные классы бактерий различаются по типу клеточной оболочки (рис. 32.2). Плазматическая мембрана *грам-положительных бактерий* окружена массив-

ной клеточной стенкой толщиной, как правило, 250 А, состоящей из пептидогликана и тейхоевой кислоты. У *грам-отрицательных бактерий* клеточная оболочка устроена более сложно: плазматическая мембрана окружена клеточной стенкой толщиной 30 А, состоящей из пептидогликана; далее располагается наружная мембрана толщиной 80 А, представляющая собой мозаику белков, липидов и липополисахаридов.

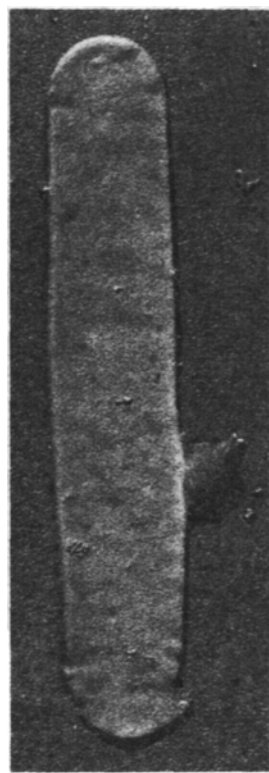


Рис. 32.1. Электронная микрофотография выделенной клеточной стенки *Bacillus licheniformis*. (Печатается с любезного разрешения д-ра Nathan Sharon.)

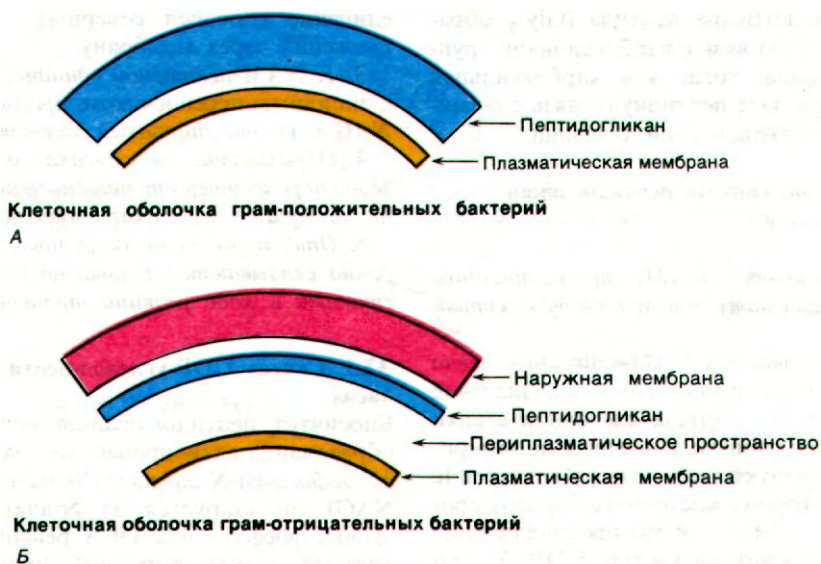


Рис. 32.2. Схематическое изображение клеточных оболочек грамположительных (А) и грамотрицательных (Б) бактерий.

32.1. Клеточная стенка - это огромная мешковидная макромолекула

Рассмотрим структуру и биосинтез клеточной стенки *Staphylococcus aureus* – грам-положительной бактерии, вызывающей гнойные процессы в таких тканях, как кожа, кости и легкие. Макромолекула, образующая клеточную стенку этой бактерии, называется *пептидогликаном*, поскольку она состоит из пептидных и углеводных единиц. В пептидогликане *линейные полисахаридные цепи поперечно сшиты короткими пептидами*. Благодаря обилию поперечных сшивок возникает одна огромная мешковидная макромолекула. В выделенном состоянии клеточные стенки сохраняют свою исходную форму (т.е. форму той бактерии, которую они окружали).

В состав пептидогликана входят три повторяющиеся единицы (рис. 32.3): 1) *дисахарид* N-ацетилглюкозамина (NAG) и N-ацетилмуравьей кислоты (NAM), соединенных β -1,4-гликозидной связью; 2) *тетрапептид* из L-аланина, D-глутамина, D-лизуина, и D-аланина; 3) *пентаглицинового пептидного мостика*. Тетрапептид представляет собой совершенно необычное соединение в двух отношениях: в нем содержатся D-аминокислоты, никогда не встречающиеся в белках, и, кроме того, входящий

в его состав остаток D-глутамина образует пептидную связь с γ -карбоксильной группой своей же боковой цепи.

В интактном протеогликане NAG и NAM чередуются последовательно, образуя линейную полисахаридную цепь. Пентаглициноновый пептид соединяет остатки NAM, принадлежащие разным полисахаридным

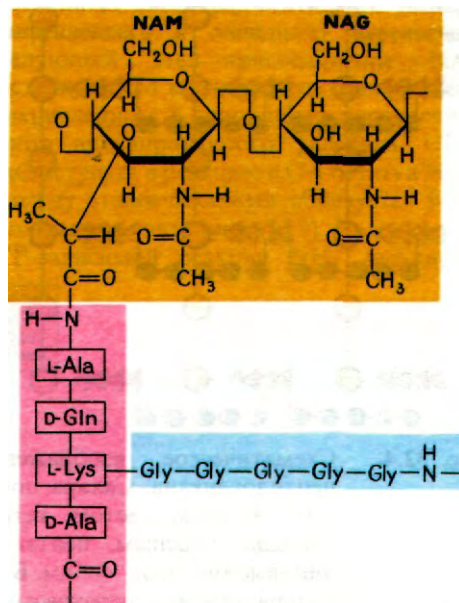


Рис. 32.3. Основное структурное звено пептидогликана из *Staphylococcus aureus*.

32. Оболочки бактериальных клеток

цепям. Аминогруппа пептида (Gly)₅ образует пептидную связь с карбоксильной группой D-аланина, тогда как карбоксильная группа (Clu)₅ дает пептидную связь с ε-аминогруппой боковой цепи L-лизина.

32.2. Стадии синтеза пептидогликана

Синтез пептидогликана происходит в пять стадий.

1. На остатке NAM, присоединенном к уридиндифосфату, выстраивается пептидное звено.

2. Образовавшееся NAM-пептидное звено переносится на липид-переносчик. Значение этой стадии для синтеза клеточной стенки состоит в следующем. Конечный полимеризованный продукт расположен вне клетки (с наружной стороны клеточного барьера проницаемости), тогда как его предшественник синтезируется внутри клетки. UDP, будучи соединением полярным, не проникает сквозь клеточную мембрану. Липидный же переносчик как совершенно неполярное со-

единение способен совершать челночные движения через мембрану.

3. К NAM-пептидной единице, связанной с липидным переносчиком, присоединяются NAG и пентаглицинового мостик.

4. Образовавшееся дисахарид-пептидное звено переносится от липидного переносчика на растущую полисахаридную цепь.

5. Отдельные полисахаридные цепи попеременно связываются пентаглициновыми мостиками в ходе реакции транспептидации.

32.3. Синтез UDP-углевод-пептидного звена

Биосинтез пептидогликанов начинается с образования активированных сахаров. Уридиндифосфат-N-ацетилглюкозамин (UDP-NAG) синтезируется из N-ацетилглюкозамин-1-фосфата и UTP в реакции, протекающей за счет гидролиза пиродифосфатной связи (рис. 32.5). Уридиндифосфат-N-ацетилмуравовая кислота (UDP-NAM) образуется из UDP-NAG и фосфоенолпирувата (рис. 32.6).

Рост пептидной цепи начинается с образования пептидной связи между аминогруппой L-аланина и карбоксильной группой остатка N-ацетилмуравовой кислоты в UDP-NAM. Далее последовательно присоединяются D-глутамат, L-ЛИЗИН и дипептид D-аланил-D-аланин (рис. 32.7). D-аминокислоты образуются из соответствующих L-изомеров под действием рацемаз, содержащих в качестве простетической группы пиридоксальфосфат. Образование каждой из этих пептидных связей протекает за счет энергии АТФ. Подчеркнем, что синтез в данном случае осуществляется не по обычному механизму синтеза белков на рибосомах, а специальными ферментами. Следовательно, информация относительно последовательности аминокислот определяется только специфичностью ферментов, а не нуклеотидной последовательностью информационной РНК. Пептид такого рода не мог бы быть синтезирован обычным путем на рибосомах, поскольку он включает D-аминокислоты и γ-пептидную связь.

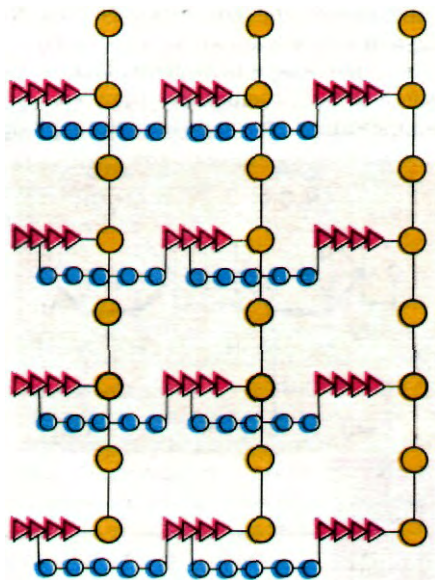


Рис. 32.4. Схематическое изображение пептидогликана. Сахара показаны желтым цветом, тетрапептиды — красным, пентаглицинового мостики синим. Благодаря обилию перекрестных сшивок клеточная стенка представляет собой одну огромную мешковидную макромолекулу.

32.4. Перенос углевод-пептидного звена на липидный переносчик

На следующем этапе происходит перенос активированного углевод-пептидного звена от UDP на липидный переносчик (рис. 32.8). Последний представляет собой длинноцепочечный спирт, содержащий 11 изопреновых

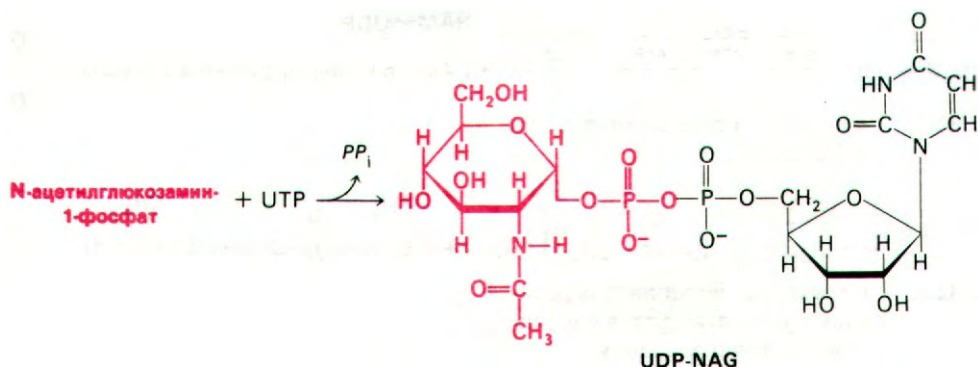


Рис. 32.5. Синтез UDP-NAG.

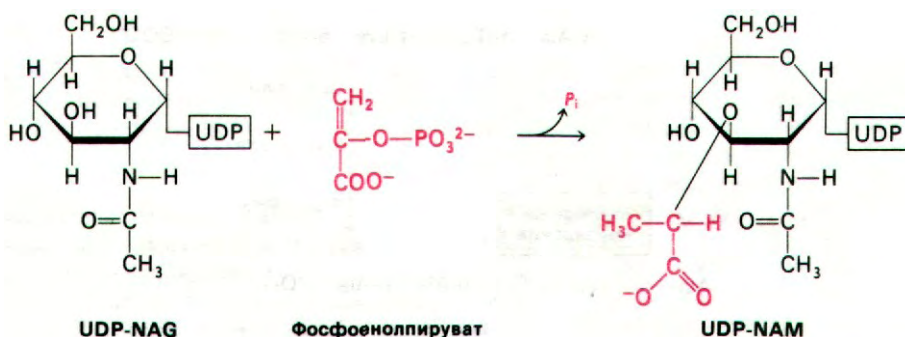
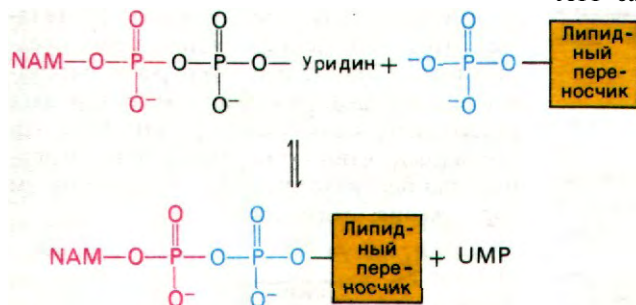


Рис. 32.6. Синтез UDP-NAM.

единиц и потому высокогидрофобный в отличие от UDP. По-видимому, именно благодаря гидрофобному характеру этого C_{55} -липида новообразованное углевод-пептидное звено преодолевает барьер проницаемости, которым служит клеточная мембрана.



Вспомним, что другой высокогидрофобный переносчик - долихолфосфат - участвует в синтезе олигосахаридов, составляющих сердцевину (олигосахаридного «ядра») гликопротеинов у эукариот (разд. 29.31).

32.5. Синтез дисахарид-пептидного звена, прикрепленного к липидному переносчику
Следующий этап - присоединение NAG к остатку NAM в углевод-пептидном звене, прикрепленном к липидному переносчику. Донор активированного углевода UDP-NAG вступает в реакцию с C-4 остатка NAM и между этими сахарами образуется β -1,4-гликозидная связь (рис. 32.9). Далее в ходе АТФ-зависимой реакции NH_4^+ амидирует

свободную α -карбоксильную группу D-глутаминовой кислоты в пептиде. Вслед за этим на ϵ -аминогруппе остатка лизина в пептиде выстраивается *пентаглициновый мостик*.

32. Оболочки бактериальных клеток

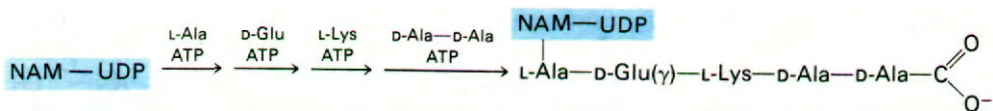


Рис. 32.7. Синтез пентапептида на UDP-NAM.

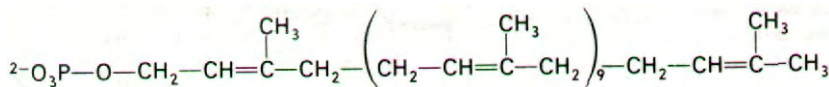


Рис. 32.8. Структура липидного переносчика, участвующего в биосинтезе клеточных стенок.

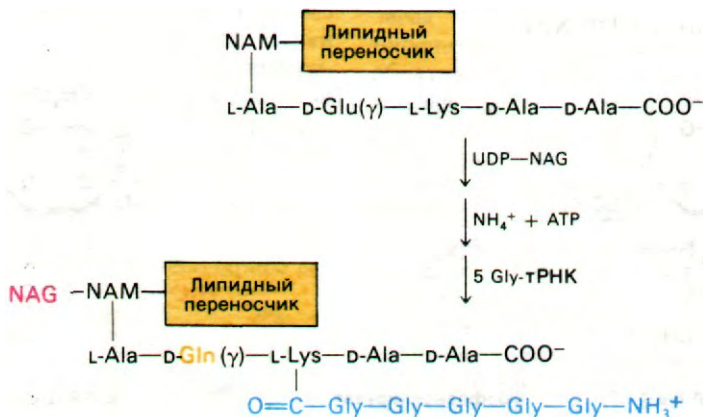


Рис. 32.9. Синтез дисахарид-пептидного звена на липидном переносчике.

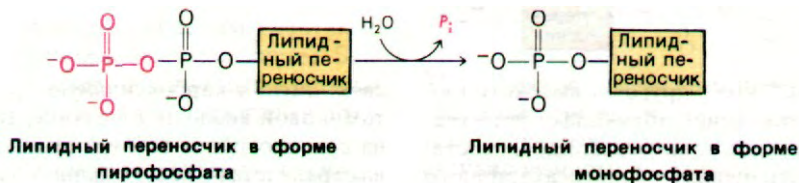
Этот пентапептид синтезируется путем *последовательного присоединения глициновых остатков, доставляемых глицил-тРНК*. Это единственный случай, когда тРНК служит донором аминокислот в ходе вне ribосомного синтеза пептида. На этом завершается образование основной структурной единицы клеточной стенки.

32.6. Перенос дисахарид-пептидного звена на растущую полисахаридную цепь

Дисахарид-пептидное звено переносится липидным переносчиком на нередуцирующий конец растущей полисахаридной цепи. Реак-

ция протекает таким образом. Атом углерода C-1 остатка NAM находится в активированном состоянии, поскольку он связан с липидным переносчиком пиррофосфатной связью. Поэтому он вступает в реакцию с C-4 конечного остатка NAG растущей полисахаридной цепи, образуя в итоге β-1,4-гликозидную связь (рис. 32.10).

Липидный переносчик высвобождается в форме пиррофосфата и далее гидролизует до монофосфата специфической фосфатазой. Этот этап дефосфорилирования представляет собой, по существу, регенерирование переносчика, способного акцептировать углевод-пептидное звено от UDP. Известен пептидный антибиотик бацитрацин, ингибирующий биосинтез клеточных стенок путем торможения этого этапа:



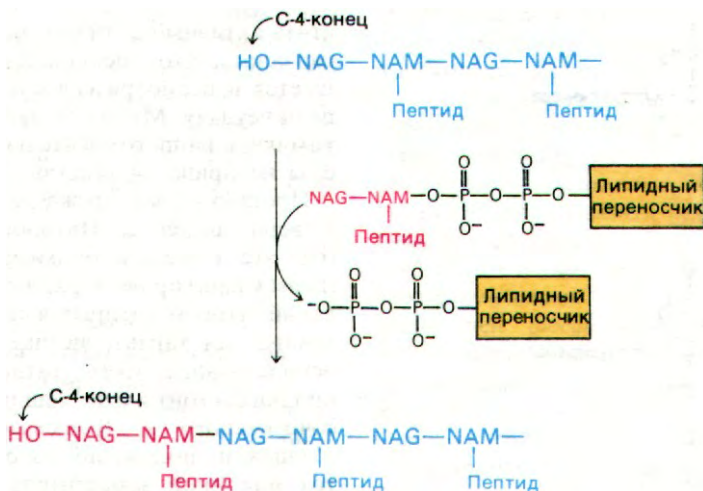


Рис. 32.10. Перенос дисахарид-пептидного звена на растущую полисахаридную цепь.

32.7. Поперечные мостики между полисахаридными цепями образуются в реакции транспептидирования

В результате реакции транспептидирования между полисахаридными цепями образуются поперечные сшивки, что приводит к формированию одной огромной молекулы, напоминающей по виду мешок. В ходе транспептидирования концевая аминогруппа одного пентаглицинового мостика атакует пептидную связь между остатками D-Ala-D-Ala другой пептидной единицы (рис. 32.11). При этом образуется пептидная связь между глицином и одним из остатков D-аланина, а второй остаток D-аланина высвобождается. Фермент, катализирующий эту реакцию, - *гликопептид-транспептидаза*. Обратите внимание, что синтез этой поперечной связи не требует расхода АТФ: реакция идет за счет свободной энергии, уже содержащейся в связи D-Ala-D-Ala. Формирование пептидной связи таким необычным способом определяется, очевидно, тем, что реакция протекает вне клетки, т.е. в отсутствие АТФ. Вспомните, что путем трансаминирования без использования АТФ образуются пептидные связи при поперечной сшивке нитей фибрина (разд. 8.21).

32.8. У грам-положительных бактерий пептидогликан покрыт тейхоевой кислотой
Поверхность грам-положительных бактерий состоит из тейхоевой кислоты, которая представляет собой полимер остатков гли-

церила (или другого углевода, например рибитола), соединенных фосфодиэфирными мостиками (рис. 32.12). Свободные гидроксильные группы этерифицируются с аланином или сахарами, в частности с глюкозой. Тейхоевая кислота присоединяется к скелету пептидогликана - последовательности остатков NAG-NAM - фосфодиэфирной связью. Удлинение цепей тейхоевой кислоты происходит путем переноса глицеролфосфата от CDP-глицерила на свободную концевую OH-группу цепи. Остатки глюкозы присоединяются к гидроксильным группам скелета тейхоевой кислоты в ходе реакции с UDP-глюкозой.

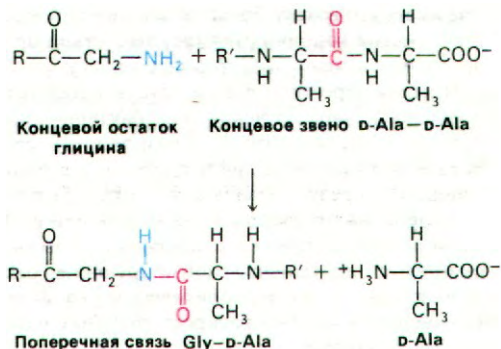


Рис. 32.11. Аминогруппа пентаглицинового мостика атакует пептидную связь между двумя остатками D-Ala; в результате формируется поперечная связь (сшивка).

32. Оболочки бактериальных клеток

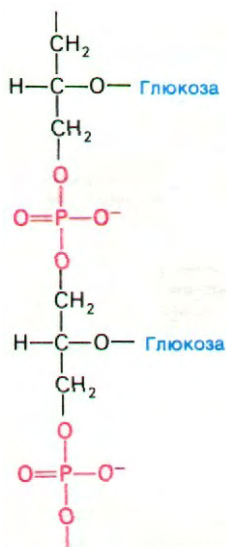


Рис. 32.12. Строение тейхоевой кислоты.

32.9. Пенициллин вызывает гибель растущих бактерий, ингибируя синтез клеточных стенок

Пенициллин был открыт в 1928 г. Александром Флемингом (Alexander Fleming) довольно случайно.

При работе с различными штаммами стафилококка часть чашек с культурами откладывали в лабораторную коллекцию и время от времени просматривали. Поскольку, когда чашки просматривали, их приходилось открывать, в чашки неизбежно попадали из воздуха различные микроорганизмы. Обратили внимание на то, что вокруг большой колонии проросшей плесени колонии стафилококка стали прозрачными и явно подвергались лизису.

Плесень переселили и далее стали проводить предварительное изучение того бактериологического вещества, которое, очевидно, синтезировалось плесенью и диффундировало в окружающую среду. Оказалось, что бульон, в котором на протяжении 1-2 недель при комнатной температуре культивировали плесень, приобретал выраженные ингибирующие, бактерицидные и бактериолитические свойства в отношении многих распространенных патогенных бактерий.

Далее было обнаружено, что экстракт из плесени *Penicillium* при введении животным не оказывал заметного токсического действия. Это послужило стимулом для дальнейших исследований. Однако, когда Флеминг попытался сконцентрировать и очи-

стить активный антибиотик, по его словам, оказалось, что «пенициллин легко разрушается, и, несмотря на все усилия, мы потерпели неудачу. Мы были бактериологи, а не химики, и наши относительно простые приемы не принесли успеха».

Прошло 10 лет, прежде чем к пенициллину вернулись снова. Патолог Хоуард Флори (Howard Florey) и биохимик Эрнст Чейн (Ernst Chain) провели ряд глубоких исследований, итогом которых явилось выделение, химическая характеристика и клиническое использование этого антибиотика. Пенициллин состоит из тиазолидинового кольца, сочлененного с β -лактамным кольцом, в одном из положений которого находится тот или иной заместитель (R), присоединенный с помощью пептидной связи. В бензилпенициллине, например, R является бензильной группой (рис. 32.13 и 32.14). Эта структура может подвергаться различным трансформациям, что служит причиной лабильности пенициллина, с которой впервые столкнулся Флеминг. Особенно неустойчиво β -лактамное кольцо. Как будет показано ниже, это свойство имеет прямое отношение к антибиотической активности пенициллина.

В 1957 г. Джошуа Ледерберг (Joshua Lederberg) показал, что бактерии, в обычных условиях чувствительные к пенициллину, могут расти в присутствии этого антибиотика, если используется гипертоническая среда. Выращенные таким образом микроорганизмы, так называемые *протопласты*, ли-

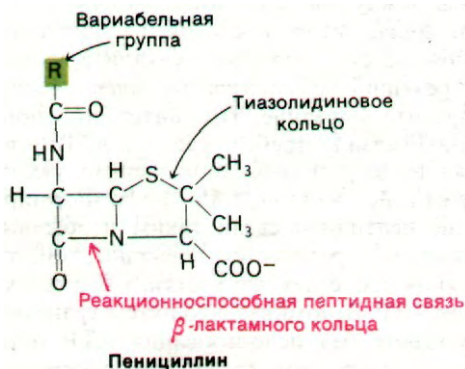
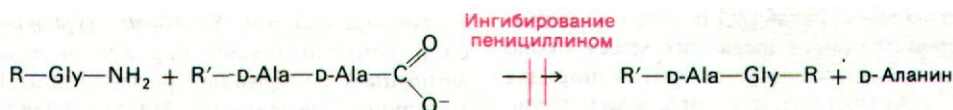


Рис. 32.13. Высокореакционноспособный участок пенициллина - пептидная связь β -лактамного кольца. В положении R могут стоять различные заместители (вариабельная группа); в бензилпенициллине R - бензильная группа.

шены клеточных стенок и потому при переносе в обычную среду подвергаются лизису. Отсюда был сделан вывод, что пенициллин препятствует синтезу клеточных стенок бактерий. В 1965 г. Джеймс Парк и Джек Стромингер (James Park, Jack Strominger) независимо друг от друга пришли к выводу, что пенициллин блокирует последний этап биосинтеза, а именно образование поперечных сшивок.

32.10. Пенициллин блокирует синтез клеточных стенок путем ингибирования реакции транспептидирования

Пенициллин ингибирует транспептидазу, поперечно сшивающую цепи протеогликана:



При нормальном течении реакции транспептидаза образует в качестве *промежуточного продукта* ацильное производное с остатком D-аланина в предпоследнем положении пептида (рис. 32.15). Этот промежуточный продукт взаимодействует далее с аминогруппой концевого глицина другого пептида. Как показали недавно проведенные исследования, пенициллин ингибирует транспептидазу путем образования ковалентной связи с остатком серина в активном центре фермента (рис. 32.16). *Комплекс пенициллиноил-фермент не подвергается деацилированию. В результате ингибирование транспептидазы пенициллином оказывается необратимым.*

Почему пенициллин является столь эффективным ингибитором транспептидазы? С помощью молекулярных моделей было выявлено, что *пенициллин сходен с одним из*

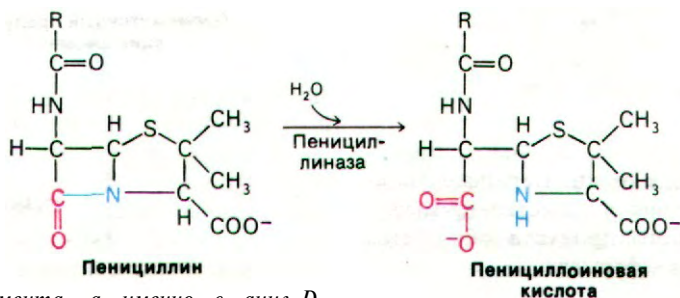
имеет напряженную конформацию, вследствие чего пептидная связь в нем становится высокореакционноспособной. В сущности, пенициллин имеет, по-видимому, структуру переходного состояния нормального субстрата этого фермента. Другими словами, пенициллин - аналог *переходного состояния*.

Любопытно сравнить пенициллин с другими необратимыми ингибиторами ферментов. Стабильный, неактивный *пенициллиноил-ферментный комплекс* совершенно аналогичен *фосфорил-ферментному комплексу*, образуемому при взаимодействии органических фторфосфатов с ацетилхолинэстеразой или сериновыми протеиназами. Однако специфичность пенициллина намного выше, чем у фторфосфатных ингибито-

ров. Мишень действия пенициллина очень строго задана его структурным сходством с концевым участком D-Ala-D-Ala новообразующей цепи пептидогликана. Следствием этой исключительной специфичности является низкая токсичность пенициллина, столь ценная при клиническом использовании. В организме человека нет ни одного фермента, распознающего D-Ala-D-Ala, а потому пенициллин не может помешать работе наших ферментов.

32.11. Некоторые бактерии резистентны к пенициллину, так как синтезируют разрушающий его фермент

Ряд бактерий синтезирует *пенициллиназу* - фермент, способный расщеплять амидную связь в β-лактамном кольце пенициллина с образованием пенициллоиновой кислоты, лишенной антибиотической активности:



субстратов фермента, а именно с ацил-D-Ala-D-Ala (рис. 32.17). Кроме того, четырехчленное β-лактамное кольцо пенициллина

32. Оболочки бактериальных клеток

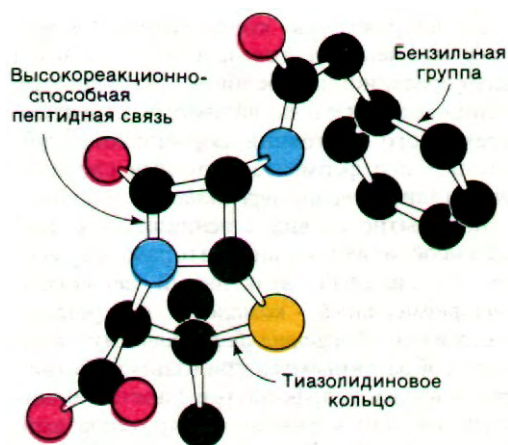


Рис. 32.14. Модель бензилпенициллина.

Был выделен целый ряд близких по структуре пенициллиназ, имеющих массу около 30 кДа и высокое число оборотов (порядка 10^3 с^{-1}). Активность фермента в значительной мере зависит от природы R-группы, присоединенной к β -лактамному кольцу пенициллина. Поэтому полусинтетические пенициллины с R-группами, защищающими их от действия пенициллиназы, представляют большую ценность для клинических целей.

Ген, кодирующий пенициллиназу, локализован в различных плазидах (разд. 31.6). Эти внехромосомные генетические элементы у некоторых видов бактерий способны быстро появляться и исчезать. В ряде бактериальных штаммов пенициллиназа является индуцируемым ферментом. По-видимому, пенициллиназа возникла в ходе эволюции как механизм детоксикации, поскольку она свойственна только микроорганиз-

мам, клеточная стенка которых образована пептидогликаном. Судя по тому, что утрата гена пенициллиназы не вызывает повреждения клетки в отсутствие антибиотика, у фермента, видимо, нет иной функции, кроме инактивации пенициллина. К тому же имеется хорошая корреляция между степенью устойчивости к действию пенициллина и общей пенициллиназной активностью.

32.12. Грам-отрицательные бактерии окружены наружной мембраной, богатой липополисахаридами

Как уже упоминалось, клеточная оболочка грам-отрицательных бактерий устроена более сложно, чем клеточная оболочка грамположительных бактерий. У грам-отрицательных микроорганизмов (например, *Escherichia coli* или *Salmonella typhimurium*) слой пептидогликана окружен *наружной мембраной*, содержащей фосфолипиды, белки и липополисахариды. Эта наружная мембрана, подобно плазматической, имеет структуру бислоя. Итак, грам-отрицательные бактерии имеют две мембраны, а грамположительные — одну. Особенность грам-отрицательных бактерий состоит также в наличии водной прослойки между плазматической мембраной и пептидогликановым слоем. В этом *периплазматическом пространстве* содержится много белков, участвующих в связывании и транспорте сахаров и других питательных веществ (разд. 37.20).

Липополисахариды (ЛПС) наружной мембраны представляют собой крайне необычные соединения, молекулы которых состоят из трех частей: *липиды А*, олигосахаридов сердцевины («ядра») и *О-боковой цепи*

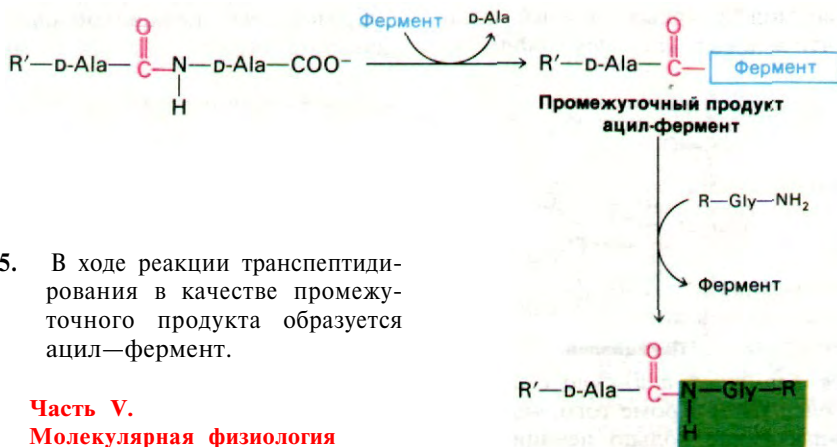


Рис. 32.15. В ходе реакции транспептирования в качестве промежуточного продукта образуется ацил—фермент.

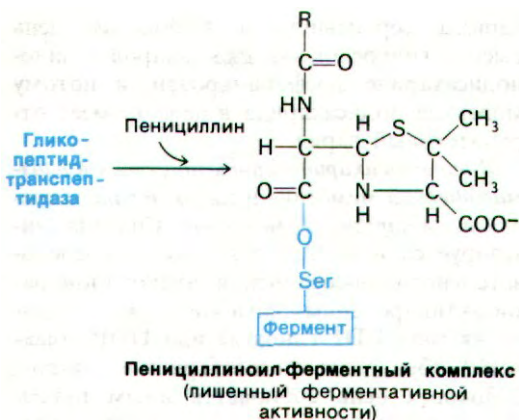


Рис. 32.16. Образование пенициллином ферментного комплекса, обладающего неограниченной стабильностью.

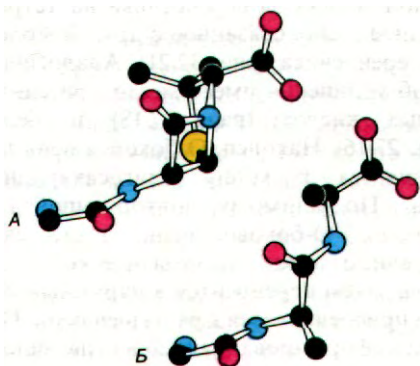


Рис. 32.17. Конформация пенициллина в области высокореакционно-способной пептидной связи (А) сходна с предполагаемой конформацией структуры R-D-Ala-D-Ala (Б) в переходном состоянии при протекании реакции транспептидирования. [Lee B., J.Mol.Biol., 61, 464 (1971).]

(рис. 32.18). Липид А - это гидрофобная часть большой (10 кДа) амфипатической молекулы. Он включает шесть цепей насыщенных жирных кислот, присоединенных к двум остаткам глюкозамина. Эти ацильные цепи составляют примерно половину наружного слоя наружной мембраны. Внутренний слой вместо цепей жирных кислот содержит фосфолипиды (рис. 32.19). Далее в молекуле липополисахарида идет



Рис. 32.18. Молекула липополисахарида состоит из трех частей: липида А, олигосахаридного «ядра» и О-боковой цепи. Здесь показана последовательность сахаров, характерная для *Salmonella typhimurium*. Сокращения: Abe - абеквоза; EtN - этанол-амин; Gal - галактоза; Glc - глюкоза; GlcN - глюкозамин; GlcNAc - N-ацетил-глюкозамин; Hep - гептулеза; KDO - 2-кето-3-дезоксиктокат; Man - манноза; Rha - L-рамноза.

область олигосахаридного «ядра». Здесь десять углеводных единиц вынесены кнаружи от липида А; еще более наружно располагается О-боковая цепь, состоящая из большого числа повторяющихся тетрасахаров.

32. Оболочки бактериальных клеток

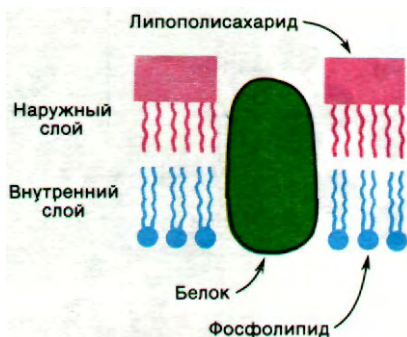


Рис. 32.19. Молекулы липополисахаридов локализованы в наружном слое, тогда как фосфолипиды — во внутреннем слое наружной мембраны.

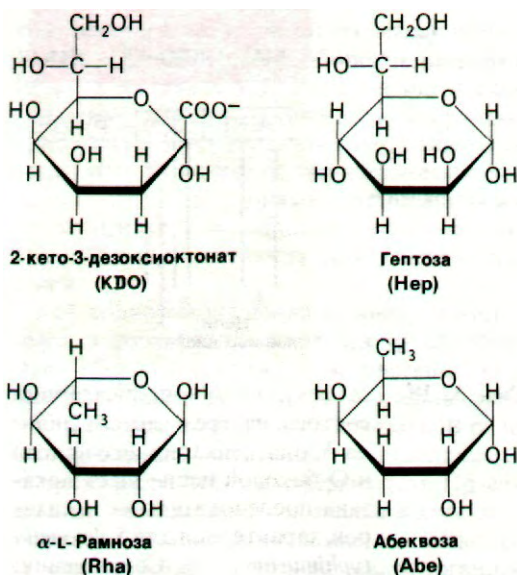


Рис. 32.20. Формулы ряда редких сахаров, входящих в состав липополисахаридов.

ридных единиц. В этих двух областях содержится несколько крайне редких в природе углеводов, а именно 8-углеродный сахар 2-кето-3-дезоксиктоанат (КДО, KDO), 7-углеродный сахар гептоза, а также 6-углеродные сахара L-рамноза и абеквоза, в молекуле которых в положении C-6 стоит $-\text{CH}_3$ вместо $-\text{CH}_2\text{OH}$ (рис. 32.20). В отличие от ацильной части липида А олигоса-

хариды сердцевины и О-боковая цепь высоко гидрофильны. Ряд сахаров в липополисахариде фосфорилирован, и потому молекула полисахарида в целом имеет отрицательный заряд.

Липополисахариды синтезируются в плазматической мембране и затем транспортируются в наружную мембрану. Сначала синтезируется липид А, а затем путем последовательного присоединения сахаров (донорами активированных сахаров служат соединения типа UDP-глюкозы или UDP-галактозы) образуется полисахаридное «ядро». О-боковая цепь собирается иным путем. Ее повторяющееся тетрасахаридное звено синтезируется на том же самом C_{55} -изопrenoидном липидном переносчике, который участвует в синтезе пептидогликана (разд. 32.4). Растущая цепь таких единиц удлиняется путем переноса олигосахарида с одной молекулы переносчика на тетрасахаридное звено, связанное с другой молекулой переносчика (рис. 32.21). Аналогичный способ удлинения имеет место при синтезе жирных кислот (разд. 17.18) и белков (разд. 27.16). Наконец, О-боковая цепь присоединяется к концу олигосахаридного «ядра». По-видимому, повторяющийся тетрасахарид О-боковой цепи образуется во внутреннем слое плазматической мембраны, затем переносится в наружный слой и там присоединяется к растущей цепи. Полностью сформированная молекула липополисахарида транспортируется из плазматической мембраны в наружную, по-видимому, в тех участках, в которых эти структуры соприкасаются.

32.13. Благодаря разнообразию О-боковых цепей грам-отрицательные бактерии противостоят защитным силам организма-хозяина

Липополисахариды содержат в высшей степени необычные сахара и своеобразные химические связи. Что дает такая вычур-

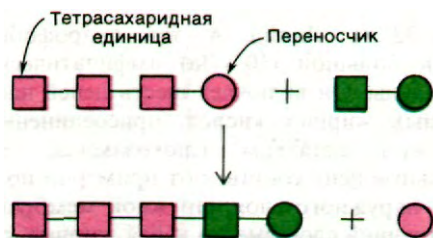


Рис. 32.21. Способ удлинения О-боковых цепей.

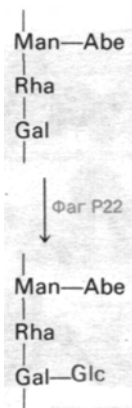


Рис. 32.22. Изменение структуры О-боковых цепей бактерии *Salmonella* при заражении умеренным фагом P22.

ность? Ключ к решению этого вопроса был получен при изучении мутантов, дефектных по синтезу липополисахаридов. Липид А и прилегающие к нему КДО олигосахаридного «ядра», по-видимому, абсолютно необходимы для выживания. Цепи насыщенных жирных кислот вносят определенный вклад в *барьерную* функцию наружной мембраны, благодаря которой периплазматические белки не выходят наружу, а наиболее ядовитые вещества не проникают в клетку. Так, пенициллин довольно плохо проходит сквозь клеточную мембрану грам-отрицательных бактерий. Кроме того, липид А придает наружной мембране *жесткость*. В отличие от липида А и олигосахаридного «ядра» О-боковые цепи не являются жизненно важными. Например, любимый многими биохимиками штамм K12 *E. coli* вообще лишен О-боковых цепей. Все же в естественных условиях грам-отрицательные бактерии почти всегда имеют О-боковые цепи. Полисахаридная наружная оболочка придает поверхности бактериальных клеток высокую степень гидрофильности, что повышает их устойчивость к фагоцитозу клетками хозяина. О-боковые цепи полисахаридов крайне разнообразны; показанная на рис. 32.18 структура - это только одна из многих известных. Грам-отрицательные бактерии способны быстро мутировать, изменяя таким путем состав своих О-боковых цепей. В результате популяция клеток хозяина, встретившись с новой для себя поверхностной структурой, не имеет на первых порах достаточного количества антител про-

тив О-боковых цепей. Следовательно, *видоизменяя О-боковые цепи, микроорганизмы на один шаг опережают систему иммунологической защиты организма-хозяина.*

Источником генетической информации, необходимой для изменения О-боковых цепей, может служить включение умеренного фага в грам-отрицательные бактерии. Например, фаг P22 обеспечивает бактериальную клетку геном фермента, добавляющего глюкозу к повторяющемуся тетрасахаридному звену в О-боковых цепях (рис. 32.22). Такое изменение называют *фаговой конверсией*. Приведенный пример демонстрирует удивительное взаимодействие между бактериальными и вирусными генами и те преимущества в эволюции, которые возникают в результате такого симбиоза.

32.14. Порин образует в наружной мембране каналы для небольших полярных молекул

В наружной мембране бактериальной клетки содержится большое количество ($\sim 10^5$) молекул *порина* - трансмембранного белка массой 37 кДа. Тримеры порина формируют каналы, по которым небольшие полярные молекулы быстро диффундируют, проходя сквозь мембрану (рис. 32.23). Поскольку диаметр канала 10 А, он пропускает молекулы массой, не превышающей 600 Да. Гидрофобные молекулы независимо от своего размера плохо проходят по каналу; *из этого следует, что пориновый канал наполнен водой и выстлан полярными группами.* Следовательно, канал приспособлен для пропускания небольших полярных метаболитов типа моносахара. Что касается полярных соединений с большей молекулярной массой, то для некоторых из них существуют специфические системы транспорта через наружную мембрану; примером может служить *система транспорта мальтозы*. Диффузия мальтозы (дисахарида) и мальтотриозы по пориновому каналу идет очень медленно; для их переноса через мембрану существует специальная система транспорта. Известны также специфические системы транспорта витамина B_{12} и хелатов железа. Некоторые фаги проникают в бактериальные клетки путем связывания со специфическими переносчиками. Так, фаг λ использует рецептор мальтозы.

Среди белков наружной мембраны количественно преобладает ($\sim 7 \cdot 10^5$ молекул на

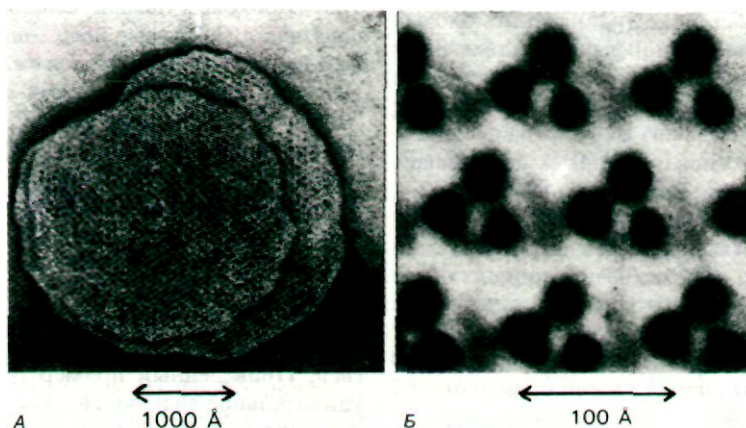
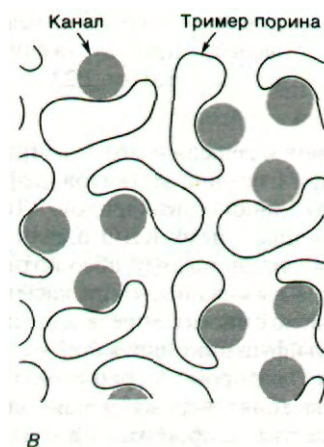


Рис. 32.23. А. Электронная микрофотография *E. coli*. Видно расположение негативно окрашенных пориновых каналов. Б. Изображение пориновых каналов, полученное после обработки и фильтрации (обесцвечивания) микрофотографии, приведенной на рис. А. В. Разъясняющая схема: показана проекция каналов порина при низком разрешении. [Steven A. C., Heggeler B. Ten, Muller R., Kistler J., Rosenbusch J. P., J. Cell Biol., 72, 292 (1977).]



клетку) небольшой *липопротеин*, содержащий всего лишь 58 остатков аминокислот. Этот белок характеризуется высокой степенью α -спирализованности; к его N-концевому цистеину ковалентно присоединены три жирные кислоты. Примерно 1/3 молекул липопroteина через ϵ -аминогруппы своего С-концевого лизина связана с COOH-группами расположенного над ним пептидогликана. Таким образом, рассматриваемый липопrotein прикрепляет наружную мембрану к подлежащему пептидогликанному слою и тем самым способствует механической устойчивости клеточной оболочки.

32.15. Новообразованные белки наружной мембраны содержат отщепляемую сигнальную последовательность

Белки, синтезируемые грам-отрицательными бактериями, могут локализоваться в цитозоле, плазматической мембране, пери-

плазматическом пространстве, наружной мембране или внеклеточной среде. Каким образом новосинтезированная молекула попадает в нужное место, выбирая из пяти возможных направлений правильное? Для выяснения этого вопроса очень важное значение имеет следующий факт: как оказалось, липопrotein наружной мембраны синтезируется в виде *пролипопroteина*, содержащего на N-конце 20 дополнительных остатков

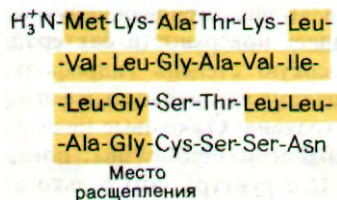


Рис. 32.24. Последовательность аминокислот N-концевой части пролипопroteина. Эта сигнальная последовательность содержит много гидрофобных остатков (показаны желтым цветом).

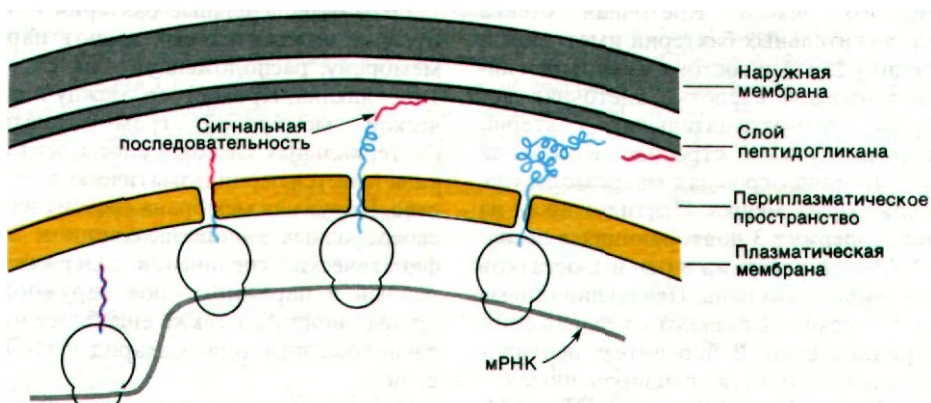


Рис. 32.25. У прокариот синтез белков клеточной оболочки происходит на рибосомах, прикрепленных к плазматической мембране. Сигнальная последовательность (показана красным цветом) новообразованного полипептида направляет рибосомы к плазматической мембране, а также обеспечивает перенос белка через нее.

аминокислот (рис. 32.24). Аналогичным образом и другие белки, предназначенные для плазматической мембраны или еще более наружнорасположенных участков, несут *сигнальные последовательности*, отличающие их от тех белков, которые остаются в цитозоле. Рибосомы, синтезирующие белки, предназначенные для выхода из цитозоля, соединяются с плазматической мембраной посредством именно этих крайне гидрофобных N-концевых последовательностей. Таким образом, начальные этапы процесса секреции у прокариот и эукариот очень сходны (разд. 29.30). Однако есть и различие: у *прокариот* рибосомы, синтезирующие белки клеточной оболочки, *прикрепляются к плазматической мембране* (рис. 32.25), тогда как у *эукариот* рибосомы с аналогичной функцией связываются с *эндоплазматическим ретикулулом* (разд. 29.29). Как и у эукариот, пептидазы прокариот отщепляют сигнальные последовательности новосинтезированных белков, как только эти белки минуют барьер мембраны.

Гипотеза сигнальных последовательностей подтверждается данными, полученными при изучении бактериальных мутантов; проиллюстрируем это на примере белка, связывающего мальтозу: его масса 38 кДа,

он участвует в поглощении мальтозы клеткой. Обычно этот белок локализован в периплазматическом пространстве. Однако при мутации, затрагивающей N-конец его предшественника, локализация белка (в его зрелой форме) меняется: замещение гидрофобной аминокислоты в сигнальной последовательности на заряженный остаток приводит к накоплению связывающего мальтозу белка в цитозоле. Таким образом, следствием замены всего лишь одного аминокислотного остатка оказалось изменение локализации белка: вместо периплазматического пространства - цитозоль. Рассмотрим обратную ситуацию: может ли белок цитозоля ошибочно попасть в наружную мембрану? Часть гена, ответственного за синтез N-концевой части белка-переносчика мальтозы (белок наружной мембраны, являющийся также рецептором фага λ), соединили с геном β -галактозидазы. Кодированный полученным геном белок-химера накапливался не в цитозоле, как это свойственно β -галактозидазе, а в наружной мембране. Этот опыт показывает, что *N-концевая последовательность новосинтезированной полипептидной цепи - это своего рода форма записи адреса белков клеточной оболочки*. Совершенно очевидно, что клетки прокариот, как и эукариот, способны транспортировать белки в соответствующие участки. Молекулярные основы этого процесса сортировки белков - важная область современных исследований.

Заключение

Бактериальные клетки окружены клеточными стенками, которые защищают их от ос-

мотического лизиса. Клеточная стенка грам-положительных бактерий имеет обычно толщину 250 А и состоит из пептидогликана и тейхоевой кислоты; клеточная поверхность грам-отрицательных бактерий имеет более сложное строение. Клеточная стенка - это одна огромная макромолекула, имеющая форму мешка. Пептидогликан из *S. aureus* содержит 3 повторяющихся звена; NAG-NAM, тетрапептид из D- и L-остатков и пентаглициновую цепь. Пентаглициновые звенья поперечно связывают отдельные полисахаридные цепи. В биосинтезе пептидогликанов используются активированные сахара в форме UDP-NAG и UDP-NAM. Биосинтез протекает в пять этапов: 1) на остатке NAM, присоединенном к UDP, наращивается пептидное звено; 2) NAM-пептид переносится на липидный переносчик; 3) к NAM-пептидной единице присоединяются NAG и пентаглициновый мостик; 4) NAG-NAM-пептидное звено переносится от липидного переносчика на растущую полисахаридную цепь; 5) аминокруппа пентаглицинового мостика на одной полисахаридной цепи атакует концевую D-Ala-D-Ala-пептидную связь в тетрапептиде, принадлежащем другой цепи, и таким образом образуется поперечная сшивка между полисахаридными цепями.

Пенициллин убивает бактерии, подавляя синтез клеточных стенок. Пенициллин похож по структуре на ацил-D-Ala-D-Ala и содержит высокореакционноспособную пептидную связь. Он необратимо ингибирует гликопептид-транспептидазу и тем самым блокирует образование поперечных сшивок в пептидогликане. Некоторые бактерии резистентны к действию пенициллина благодаря наличию пенициллиназы, гидролизующей и тем самым инактивирующей пенициллин.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Nikaido H., Nakae T., 1979. The outer membrane of gram-negative bacteria, *Advan. Microbiol. Physiol.*, 14, 163-250.
DiRienzo J.M., Nakamura K., Inouye M., 1978. The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly, and functions, *Ann. Rev. Biochem.*, 47, 481-532.

Sharon N., 1969. The bacterial cell wall, *Sci. Amer.*, 220(5), 92-98.

Оболочки бактериальных клеток

Leive L. (ed.), 1973. *Bacterial Membranes and Walls*, Marcel Dekker. [Прекрасный сборник критических обзоров. Статьи Гюйсена и Шокмана (Ghuysen, Shockman) по биосинтезу пептидогликана и Накайдо (Nikaido) по биосинтезу клеточных оболочек

Грам-отрицательные бактерии в отличие от грам-положительных имеют наружную мембрану, расположенную над слоем пептидогликана. Кроме того, между плазматической мембраной грам-отрицательных бактериальных клеток и слоем пептидогликана имеется периплазматическое пространство. Наружная мембрана состоит из крайне своеобразных липополисахаридов. Эти амфипатические соединения содержат закоренный в наружном слое наружной мембраны липид А, а также еще более наружно расположенные олигосахарид и О-боковые цепи.

О-боковые цепи, в состав которых входят необычные сахара, образуются путем полимеризации тетрасахаридных звеньев на липидном переносчике. Разнообразие структуры О-боковых цепей позволяет грам-отрицательным бактериям обойти иммунологическую защиту организма-хозяина. По содержащим воду каналам в наружной мембране происходит диффузия небольших полярных (но не гидрофобных) молекул; эти каналы образованы трансмембранно расположенным белком порином. Молекулы большей величины, например мальтоза или витамин В₁₂, проходят сквозь мембрану благодаря наличию специфических систем их транспорта. К числу основных белковых компонентов наружной мембраны относится небольшой липопротейн, посредством которого мембрана прикрепляется к подлежащему слою пептидогликана. Белки клеточной оболочки синтезируются на рибосомах, присоединенных к плазматической мембране. Предшественники этих белков содержат N-концевые сигнальные последовательности, которые отщепляются после переноса белка-предшественника через мембрану.

грам-отрицательных микроорганизмов имеют непосредственное отношение к теме данной главы.]

Nikaido H., 1979. Permeability of the outer membrane of bacteria, *Angew. Chem. (Int. Ed.)*, 18, 337-350.

Hussey H., Baddiley J., 1976. Biosynthesis of bacterial cell walls. In: *Martonosi A. (ed), The Enzymes of Biological Membranes*, vol. 2, pp. 227-326, Plenum.

Osborn M.J., 1971. The role of membranes in the synthesis of macromolecules. In: *Rothfield L.L. (ed.), Structure and Function of*

Biological Membranes, pp. 343-400, Academic Press.

Steven A.C., ten Heggeler B., Muller R., Kistler J., Rosenbusch J.P., 1977. Ultrastructure of a periodic protein layer in the outer membrane of *Escherichia coli*, *J. Cell Biol.*, 72, 292-301.

Пенициллин и бацитрацин

Fleming A., 1929. On the antibacterial action of cultures of a penicillinium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*, *Brit. J. Exp. Pathol.*, 10, 226-236.

Chain E., 1971. Thirty years of penicillin therapy, *Proc. Roy. Soc. London (B)*, 179, 293-319.

Strominger J.L., Blumberg P.M., Suganaka H., Umbreit J., Wickus G.G., 1971. How penicillin kills bacteria: progress and problems, *Proc. Roy. Soc. London (B)*, 179, 369-383.

Yocum R.R., Waxman D.J., Rasmussen J.R., Strominger J.L., 1979. Mechanisms of penicillin action: penicillin and substrate bind covalently to the same active serine in two bacterial

D-alanine carboxypeptidases, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 76, 2730-2734.

Stone K.J., Strominger J.L., 1971. Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C₃₅-isoprenyl pyrophosphate, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 68, 3223-3227.

Boyd D.B., 1977. Transition state structures of a dipeptide related to the mode of action of *b*-lactam antibiotics, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 74, 5239-5243.

Сигнальные последовательности и локализация белков

Chang C.N., Model P., Blobel G., 1979. Membrane biogenesis: cotranslational integration of the bacteriophage ϕ coat protein into an *Escherichia coli* membrane fraction, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 75, 4891-4895.

Inouye S., Wang S., Sekizawa J., Halejova S., Inouye M., 1977. Amino acid sequence for the peptide extension on the prolipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 74, 1004-1008.

Bedouelle H., Bassford P.J., Fowler A.

V., Zabin I., Beckwith J., Hofnung M., 1980. Mutations which alter the function of the signal sequence of the maltose binding protein of *Escherichia coli*, *Nature*, 285, 78-81.

Emr S., Hedgpeth J., Clement J.-M., Silhavy T.J., Hofnung M., 1980. Sequence analysis of mutations that prevent export of λ receptor, an *Escherichia coli* outer membrane protein, *Nature*, 285, 82-91.

Bassford P., Beckwith J., 1979. *Escherichia coli* mutants accumulating the precursor of a secreted protein in the cytoplasm, *Nature*, 277, 538-541.

Emr S.D., Schwartz M., Silhavy T.J., 1978. Mutations altering the cellular localization of the phage λ receptor, an *Escherichia coli* outer membrane protein, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 75, 5802-5806.

Lin J.J.C., Kanazawa H., Ozols J., Wu H.C., 1978. An *Escherichia coli* mutant with an amino acid alteration within the signal sequence of outer membrane prolipoprotein, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 75, 4891-4895.

ГЛАВА 33

Иммуноглобулины

К началу этого столетия были выявлены многие важнейшие свойства иммунного ответа. Однако представление о защитных механизмах возникло гораздо раньше, о чем свидетельствуют записи Фукидида о чуме, поразившей Афины в 430 до н.э.:

«Пусть другие рассуждают о ее происхождении и причинах, вызвавших ее появление, если только для такого страшного бедствия могут быть найдены достаточные причины... что до меня, я просто опишу ее природу и объясню, по каким симптомам ее можно распознать, если она когда-нибудь разразится снова. Тем лучше я смогу это сделать, что болел сам и видел, как развивалась болезнь у других...

Именно у тех, кто выздоровел после этой болезни, больные и умирающие вызвали особенное сочувствие. Пережившие болезнь знали по своему опыту, что это такое, и не боялись более за себя, *ибо один и тот же человек никогда не заболел вторично* или по крайней мере не умер при этом. И таких людей не только поздравляли другие, но и сами они в радости *преисполнялись тщетной надеждой, что отныне они спасены от какой-бы то ни было болезни*».

Называя надежду на спасение тщетной, Фукидид явно имел в виду *специфичность* защиты, свойственную иммунной системе.

33.1. Основные определения

Антитела (или *иммуноглобулины*) - это белки, синтезируемые в организме животного в ответ на присутствие чужеродного вещества. Антитело обладает специфическим

сродством к стимулировавшему его синтез чужеродному веществу. *Антиген* (или *иммуноген*) - чужеродная макромолекула, способная вызвать образование антител. Эффективными антигенами обычно служат белки, полисахариды и нуклеиновые кислоты. Антитела проявляют специфичность в отношении определенного участка молекулы антигена; этот участок называют *антигенной детерминантой*.

Чужеродные молекулы малого размера не вызывают образования антител. Однако если они присоединены к макромолекулам, то может иметь место синтез специфических антител. В этом случае макромолекула выполняет функцию *носителя* присоединенной химической группы, называемой *гаптенной детерминантой*. Сама по себе чужеродная молекула малого размера называется *гаптен*ом.

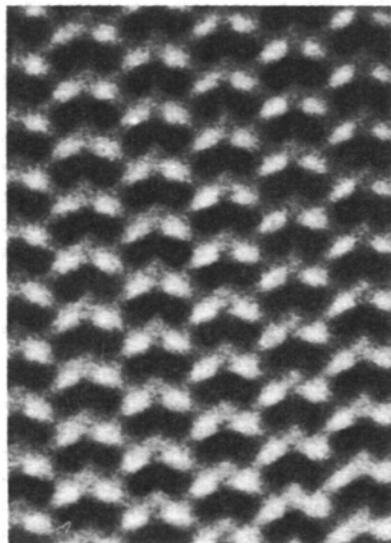


Рис. 33.1. Электронная микрофотография кристалла молекул антитела. [Labaw L. W., Davies D. R., J. Ultrastruct. Res., 40, 349 (1972).]

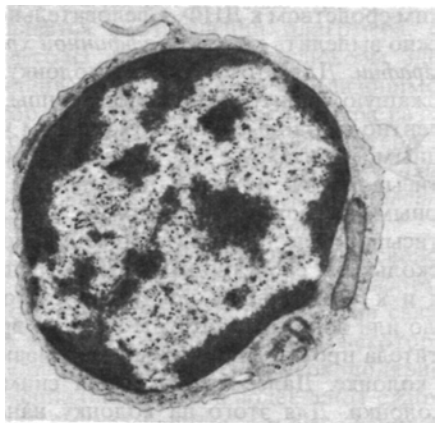


Рис. 33.2. Электронная микрофотография В-лимфоцита. (Печатается с любезного разрешения L. Mercer.)

Молекулы антител секретируются *плазматическими клетками*, образовавшимися из В-лимфоцитов (рис. 33.2). Другой класс лимфоцитов, а именно *Т-лимфоциты*, обуславливает клеточный иммунный ответ, который дополняет гуморальный ответ, выражающийся в появлении растворимых антител. В этой главе мы рассмотрим только гуморальный ответ, поскольку его молекулярные основы изучены значительно лучше. Однако нужно подчеркнуть, что молекулы антител - всего лишь один из компонентов большой, согласованно функционирующей системы молекул и клеток, распознающих и удаляющих чужеродные вещества.

33.2. Синтез специфических антител в ответ на антиген

Животные способны синтезировать специфические антитела против практически любой химической группы. Особенно эффективно стимулирует образование антител динитрофенол (ДНФ), и потому его широко используют в качестве гаптенной детерминанты. Антитела против ДНФ получают следующим образом.

1. ДНФ-группы присоединяют ковалентно к белку-носителю, например к альбумину сыворотки быка (БСА), используя взаимодействие фтординитробензола с боковыми цепями лизина или других нуклеофильных остатков белка (рис. 33.4).

2. ДНФ-БСА вводят кролику в качестве иммуногена (антигена). Спустя несколько

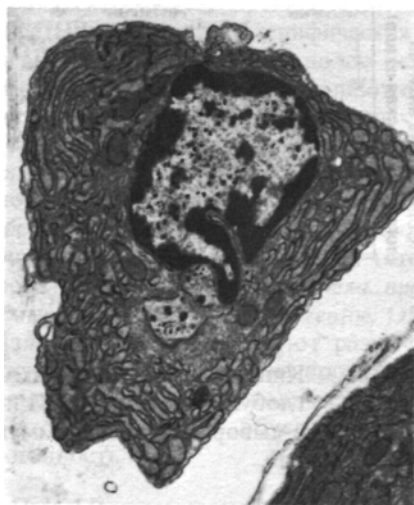


Рис. 33.3. Электронная микрофотография плазматической клетки. Виден очень хорошо развитый шероховатый эндоплазматический ретикулум. (Печатается с любезного разрешения L. Mercer.)

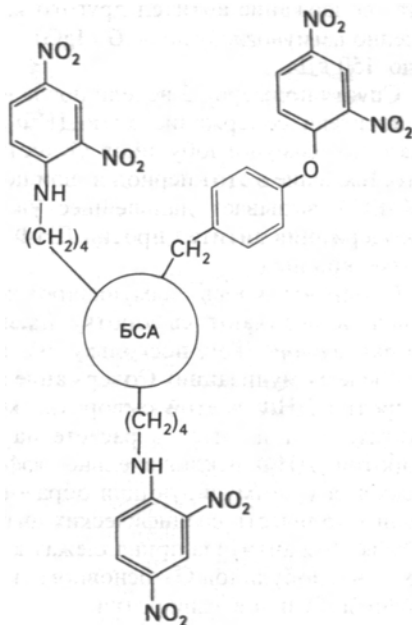


Рис. 33.4. Динитрофенильное производное бычьего сывороточного альбумина (ДНФ-БСА) - эффективного антигена.

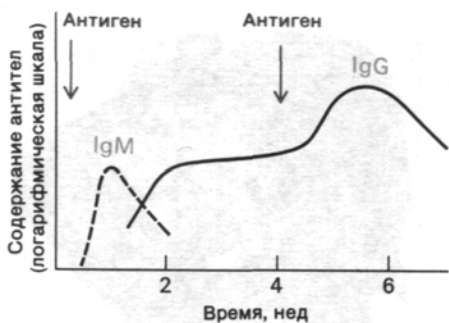


Рис. 33.5. Кинетика появления иммуноглобулинов M и G (IgM и IgG) в сыворотке после иммунизации.

дней содержание антител против ДНФ-альбумина начинает возрастать (рис. 33.5). Эти первыми появляющиеся антитела принадлежат к классу иммуноглобулинов M (IgM) массой около 1000 кДа.

3. Спустя примерно 10 дней после введения антигена количество иммуноглобулина M начинает уменьшаться, но одновременно растет содержание антител другого класса, а именно иммуноглобулинов G (IgG) массой около 150 кДа.

4. Спустя примерно 3 недели после введения антигена содержание анти-ДНФ-антител класса иммуноглобулинов G достигает плато. Введение в этот период новой порции ДНФ-БСА вызывает дальнейшее увеличение содержания антител против ДНФ в сыворотке кролика.

5. Собирают кровь иммунизированного кролика и получают сыворотку (называемую *антисывороткой*, поскольку она получена после иммунизации). Содержание антител против ДНФ в этой сыворотке может достигать 1 мг антител в расчете на 1 мл сыворотки. ДНФ исключительно эффективен как агент, стимулирующий образование больших количеств специфических антител. Почти все эти антитела принадлежат к классу иммуноглобулинов G — основному классу иммуноглобулинов сыворотки.

6. Следующий этап — отделение антител против ДНФ от антител с другой специфичностью и от прочих сывороточных белков. Антитела против ДНФ отличаются от остальных белков антисыворотки очень вы-

соким сродством к ДНФ. Следовательно, их можно выделить методом *аффинной хроматографии*. Для этого готовят колонку, содержащую динитрофенильные группы, ковалентно связанные с нерастворимым углеводным носителем. На колонку наносят антисыворотку и затем промывают буферным раствором. Большая часть белков антисыворотки проходит сквозь колонку, поскольку их сродство как к ДНФ-группам, так и к углеводному носителю ничтожно мало или вовсе отсутствует. В то же время антитела против ДНФ прочно связываются на колонке. Далее эти антитела снимают с колонки. Для этого на колонку наносят ДНФ в высокой концентрации: добавленный ДНФ связывается с антителами, вытесняя их из связи с динитрофенильными группами нерастворимого углеводного носителя. Растворимый комплекс, состоящий из ДНФ и антител против ДНФ, выходит с колонки. Далее ДНФ удаляют путем диализа или ионно-обменной хроматографии, и в результате остается препарат очищенных антител.

33.3. Участки антител, связывающие антиген, подобны активным центрам ферментов

Участки связывания антигена в молекулах антител во многих отношениях сходны с активными центрами ферментов.

1. Константы связывания для гаптенов были определены методами равновесного диализа и спектроскопии. Например, присоединение окрашенного гаптена типа динитрофенильного производного тушит флуоресценцию остатков триптофана в белке-антителе. Степень тушения служит мерой насыщения участков связывания в молекуле белка. Для большинства гаптенов константы связывания лежат в пределах от 10^4 до 10^{10} М. Следовательно, стандартная свободная энергия связывания составляет от -6 до -15 ккал/моль, т. е. лежит в границах, характерных для фермент-субстратных и фермент-коферментных комплексов. Кроме того, комплексы гаптен-антитело образуются под действием тех же сил, что и фермент-субстратные комплексы. Сочетание слабых нековалентных связей типа электростатических, водородных и вандерваальсовых обеспечивает прочное и специфическое связывание.

2. Проверяли способность антител к декстрану (полисахариду, состоящему из остатков глюкозы) связывать олигомеры. Обна-

ружили, что полное связывающее сродство проявляется в отношении олигомера, состоящего из шести остатков глюкозы. Здесь напрашивается сравнение с лизоцимом, у которого в щели активного центра размещается тоже шесть углеводных остатков. Из этого сопоставления следует, что *длина связывающего участка в молекулах антител против декстрана составляет 25 Å*.

3. На основе спектроскопических свойств ряда гаптен можно получить информацию о степени полярности участков связывания в молекулах антител. Так, некоторые нафталины, находясь в высокополярном окружении (например, в воде), дают слабую желтую флуоресценцию, а в выражено неполярном окружении (например, в гексане)-интенсивно голубую. Если такой нафталиновый гаптен присоединяется к специфическому антителу, то появляется интенсивно голубая флуоресценция, что указывает на изгнание воды из участка связывания. Как правило, участки связывания представляют собой *неполярные ниши* в молекуле антитела; это увеличивает прочность связывания антигена по причинам, которые уже обсуждались применительно к фермент-субстратному взаимодействию (разд. 6.8).

4. Гаптен довольно точно соответствует связывающему участку по структуре. *Специфичность связывания, безусловно, очень высока, но не абсолютна*. Гаптен прочно удерживается в участке связывания, имея, таким образом, малую свободу вращения. Константа скорости связывания для многих гаптен составляет около $10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Столь высокая константа свидетельствует о том, что скорость процесса контролируется скоростью диффузии. Связывание гаптена не сопровождается, по-видимому, существенными структурными перестройками.

33.4. Препараты антител с определенной специфичностью обычно гетерогенны

Антитела имеют существенное отличие от ферментов: *большинство нормальных антител с определенной специфичностью, например антитела против ДНФ, неоднородны по молекулярному составу*. Анализ связывания динитрофенильных гаптен с препаратом анти-ДНФ-антител выявил целый набор величин сродства. Некоторые молекулы антител связывают ДНФ с $K = 10^{-6} \text{ M}$, тогда как другие - с $K = 10^{-10} \text{ M}$. В отличие от этого ферменты, как правило, характеризуются только одной константой связывания данного субстрата или кофермента. Да-

лее при электрофорезе препарата антител против ДНФ или других специфических антител выявляется множество полос белка. Ферменты же при электрофорезе дают одну полосу или небольшое число отдельных полос (например, изоферменты лактат-дегидрогеназы).

Гетерогенность антител с данной специфичностью определяется самой природой иммунного ответа. В чем причина гетерогенности? Оказалось, что *антитела, продуцируемые одной клеткой, гомогенны*. Однако различные клетки образуют разные по структуре антитела. Антитела против ДНФ синтезируются большим количеством различных клеток, что и обуславливает их гетерогенность.

33.5. При ферментативном расщеплении иммуноглобулина G образуются активные фрагменты

Иммуноглобулин G имеет массу 150 кДа. При изучении такого большого белка целесообразно предварительно расщепить его на активные фрагменты. В 1959 г. Родни Портер (Rodney Porter) показал, что при ограниченном протеолизе папаином имму-

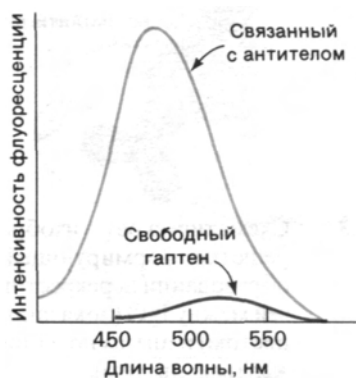


Рис. 33.6. Флуоресценция ϵ -дансиллина отчетливо меняется при связывании этого гаптена со специфическими антителами. Сдвиг максимума флуоресценции в сторону более коротких волн и увеличение интенсивности флуоресценции свидетельствуют о том, что связывание гаптена происходит в неполярном участке.

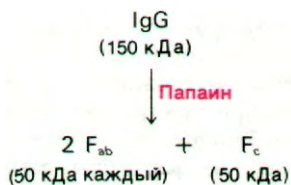


Рис. 33.7. Протеолитическое расщепление иммуноглобулина G (IgG).

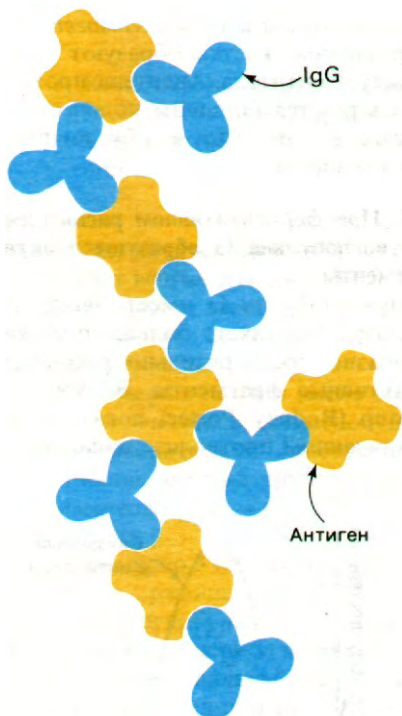


Рис. 33.8. Схематическое изображение решетки, формирующейся при образовании перекрестных связей между IgG (показано синим цветом) и антигеном (показано желтым цветом).

ноглобулин G расщепляется на три активных фрагмента массой по 50 кДа. Два фрагмента связывают антиген. Их обозначили F_{ab} (ab - от англ. antigen binding - связывающий антиген, F - от англ. fragment - фрагмент), каждый из F_{ab} содержит по одному участку связывания гаптена или антигена, причем по связывающему сродству этот участок не отличается от всей мо-

лекулы в целом. Однако, будучи одновалентным (т.е. имея один участок связывания), F_{ab} не дает осадка с антигеном; этим F_{ab} отличается от интактной молекулы иммуноглобулина G, содержащей два идентичных участка связывания антигена. Иммуноглобулин G может дать осадок с антигеном, содержащим не одну, а несколько антигенных детерминант. При этом формируется структура в виде протяженной решетки, где каждая молекула антитела образует перекрестные связи с двумя и более антигенами и наоборот (рис. 33.8). Осадок достигает наибольшего размера, если антитело и антиген присутствуют в эквивалентных количествах.

Третий фрагмент (также 50 кДа), обозначаемый F_c, не способен к связыванию антигена, но обладает другими биологически важными функциями. В отличие от F_{ab} этот фрагмент способен проникать через плацентарную мембрану. Следовательно, способность иммуноглобулина G проходить сквозь плаценту и попадать в систему кровообращения плода определяется наличием на F_c специфического участка, обеспечивающего перенос через плаценту. На F_c имеется также участок связывания комплемента. Связывание антитела с антигенной детерминантой на поверхности чужеродной клетки часто ведет к лизису последней. Такой результат взаимодействия антитела с антигеном опосредован группой белков, носящих общее название комплемент. Присоединение одного из этих белков к комплексу антиген-антитело и запускает последовательность реакций, приводящих к лизису чужеродной клетки. В обозначении фрагмента F_c индекс «с» (от англ. crystallizable - кристаллизуемый) указывает на способность этого фрагмента кристаллизоваться. Обнаружение этого свойства послужило первым указанием на гомогенность F_c; что касается фрагментов F_{ab}, то они гетерогенны и обычно не кристаллизуются.

33.6. Иммуноглобулин G состоит из L- и H-цепей

Следующий важный шаг в развитии иммунологии был сделан также в 1959 г., когда Джералду Эделману (Gerald Edelman) удалось показать, что иммуноглобулин G состоит из полипептидных цепей двух видов. Белок обрабатывали следующим образом: дисульфидные мостики в молекуле восстанавливали меркаптоэтанолом; далее разрушали нековалентные связи 6 М раствором

мочевины. При хроматографическом анализе смеси было обнаружено, что иммуноглобулин состоит из полипептидных цепей массой 25 и 50 кДа, обозначенных соответственно как *легкие* (L) и *тяжелые* (H) цепи.

Впоследствии Портер подобрал более мягкие условия обработки, позволившие реконструировать иммуноглобулин G из двух H- и двух L-пепей. На основе этих исследований он предложил модель (рис. 33.9) субъединичной структуры иммуноглобулина G, в соответствии с которой каждая L-цепь соединена с H-цепью дисульфидной связью. H-цепи, кроме того, связаны между собой по крайней мере одной дисульфидной связью. В целом *субъединичная структура иммуноглобулина G* L_2H_2 .

Далее удалось определить, какие участки предложенной структуры соответствуют фрагментам, образующимся при расщеплении папаином. Папаин отщепляет H-цепи со стороны C-конца от дисульфидного мостика, соединяющего L- и H-цепи. В итоге F_{ab} состоит из целой L-цепи и аминоконцевой половины H-цепи, тогда как F_c состоит из C-концевых половин обеих H-цепей. Часть H-цепи, содержащаяся в F_{ab} , обозначается F_d .

33.7. Иммуноглобулин G - гибкая Y-образная молекула

Электронно-микроскопические исследования, проведенные Робинот Валентайном и Майклом Грином (Robin Valentine, Michael Green), показали, что иммуноглобулин G имеет форму буквы Y и что гаптен присоединяется на концах F_{ab} -единиц. F_c -единица и две F_{ab} -единицы в интактном антителе соединены между собой своего рода шарниром, благодаря чему угол между F_{ab} -единицами может меняться быстро и в большом диапазоне величин (рис. 33.10). Этот вид *подвижности (гибкости) шарнирного типа* усиливает комплексообразование между антигеном и антителом, так как способствует лучшему связыванию поливалентных антигенов. В самом деле, таким путем расстояние между антиген-связывающими участками на концах F_{ab} -единиц может быть приведено в соответствие с расстоянием между специфическими детерминантами на антигене (например, на вирусе, имеющем много повторяющихся субъединиц). Как правило, если связывание поливалентного антигена происходит в двух участках связывания антигена, то средство

возрастает в 10^4 раз по сравнению со связыванием в одном участке. Не исключено, что подвижность шарнирного типа играет также определенную роль и в передаче информации от F_{ab} -единиц на F_c -единицу.

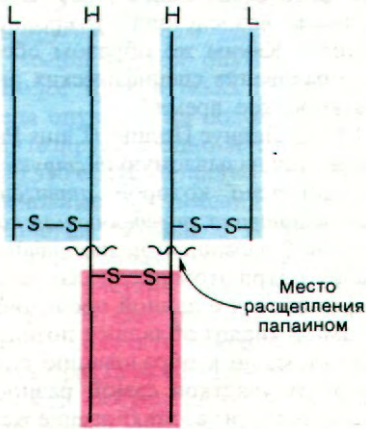


Рис. 33.9. Субъединичная структура $IgG-L_2H_2$. F_{ab} -фрагменты, высвобождающиеся при расщеплении папаином, показаны синим цветом, F_c -фрагмент - красным.

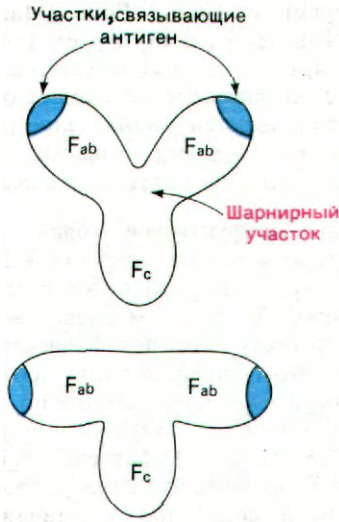


Рис. 33.10. Иммуноглобулин G имеет Y-образную форму. Наличие в молекуле шарнирного соединения обуславливает подвижность отдельных участков.

33.8. Антитела образуются под действием отбора или инструкции?

Специфичность ферментов вырабатывалась на протяжении миллионов лет эволюции. Специфические антитела появляются в крови животного всего лишь через несколько недель после воздействия чужеродной детерминанты. Каким же образом обеспечивается образование специфических антител в столь короткое время?

1. В 1940 г. Лайнус Полинг (Linus Pauling) предложил так называемую *инструктивную теорию*, согласно которой *антиген действует как матрица, определяющая конформацию новообразованной полипептидной цепи антитела*. При этом предполагалось, что молекулы антител с данной последовательностью аминокислот обладают потенциальной способностью к образованию антиген-связывающих участков самой разнообразной специфичности; возникновение же определенной специфичности зависит от природы антигена, присутствующего во время свертывания полипептидной цепи. Согласно инструктивной теории, специфическое антитело не может образоваться в отсутствие соответствующего антигена.

2. *Селекционная теория (теория отбора)*, которую в 50-х годах выдвинули Макферлейн Вернет и Нильс Ерне (Macfarlane Burnet, Niels Jerne), постулирует, что антиген регулирует только количество синтезируемых специфических антител. Согласно этой теории, *антиген-связывающие участки специфических антител полностью детерминированы еще до встречи с антигеном*.

33.9. Конец инструктивной теории

Инструктивная теория предсказывала, что если молекула антитела будет развернута (денатурирована), а затем вновь свернется (ренатурируется), то ее специфичность будет утрачена. Этому предсказанию противоречили экспериментальные данные по ренатурации рибонуклеазы, полученные в лаборатории Христиана Анфинсена (Christian Anfinsen). Вспомним, что денатурированная рибонуклеаза спонтанно восстанавливает исходную трехмерную структуру, специфичность и каталитическую активность после удаления денатурирующего агента (разд. 2.12). Для ренатурации присутствие субстрата не требуется. Этот принципиально важный факт относительно рибону-

клеазы послужил стимулом для постановки аналогичных опытов с антителами (рис. 33.11). Были взяты F_{ab} -фрагменты антител против ДНФ; использование фрагментов относительно небольшого размера, а не целых антител значительно упрощает эксперимент. F_{ab} -фрагмент обрабатывали высокоэффективным денатурирующим агентом - 7М солянокислым гуанидином. Денатурированный таким образом F_{ab} -фрагмент терял сродство к гаптену (ДНФ). Данные гидродинамического и оптического анализа свидетельствовали о том, что конформация денатурированного F_{ab} была близка к случайному клубку. Далее гуанидин-HCl удаляли путем диализа; при этом денатурированный F_{ab} восстанавливал исходную пространственную структуру *в отсутствие гаптена ДНФ*. Самым поразительным было то, что ренатурированный F_{ab} обладал высоким сродством к динитрофенольным гаптенам. Поскольку ренатурация происходила в отсутствие гаптена, не оставалось сомнений, что *специфичность участка связывания антигена определяется только последовательностью аминокислот белка-антитела*. Результат этого эксперимента свидетельствовал в пользу отбора и противоречил основному предсказанию инструктивной теории. Более того, было обнаружено, что *клетки, продуцирующие антитела, способны синтезировать их в большом количестве в отсутствие антигена*. Это окончательно подтвердило основной тезис селекционной теории: *антиген влияет на количество продуцируемых специфических антител, но не на их аминокислотную последовательность или трехмерную структуру*.

33.10. Иммуноглобулины миеломы и гибридомы гомогенны

Как же могут синтезироваться специфические антитела до появления антигенов? Гетерогенность антител и трудности анализа смеси их молекул на протяжении многих лет служили препятствием к изучению этой проблемы. Выйти из этого положения удалось путем использования такого объекта исследования, как *множественная миелома* - злокачественное перерождение клеток, продуцирующих антитела. При этом виде рака происходит перерождение одного лимфоцита или плазматической клетки, что ведет к неконтролируемому клеточному делению. Следовательно, в этом случае образуется большое число клеток одного типа. Они составляют *клон*, т.е. происходят от одной



Рис. 33.11. F_{ab}-Фрагмент анти-ДНФ-антител восстанавливает способность к связыванию ДНФ после денатурации (разворачивания структуры) и последующей ренатурации (восстановления исходной структуры) в отсутствие антигена. Этот опыт показывает, что специфичность определяется природой последовательности аминокислот.

клетки и имеют одни и те же свойства. Такие опухоли секретируют большие количества какого-то одного иммуноглобулина. Иммуноглобулины миеломы обладают нормальной

структурой и во всех отношениях соответствуют норме, но каждый из них представляет собой гомогенный образец одного из многочисленных антител, присутствующих в данном организме. Миеломы развиваются у мышей. Эти опухоли можно трансплантировать другим мышам; после пересадки от одной мыши другой опухоль пролиферирует. Более того, в таких продуцирующих антитела опухолях из поколения в поколение синтезируется одно и то же антитело. Именно это обстоятельство привело к тому, что основные достижения молекулярной иммунологии связаны с изучением гомогенных миеломных иммуноглобулинов.

Сезар Милстайн и Джордж Кёлер (Cesar Milstein, Georges Kohler) обнаружили, что можно получить в большом количестве антитела практически любой заданной специфичности посредством *слияния клетки, продуцирующей антитело, с клеткой миеломы*. Для этого мышь иммунизируют определенным антигеном и спустя несколько недель удаляют у нее селезенку. Далее берут смесь иммунокомпетентных клеток этой селезенки и *in vitro* вызывают их слияние с клетками миеломы. Затем выделяют гибридные клетки путем культивирования смеси всех клеток в среде, поддерживающей рост только гибридных (но не исходных) клеток. В некоторых из полученных гибридных клеток сохраняются неопластические свойства миеломных клеток, и при этом они синтезируют антитела заданной специфичности. Такие *клетки гибридомы* как в первом, так и во всех последующих поколениях устойчиво продуцируют большие количества гомогенных антител со специфичностью, детерминированной исходной клеткой селезенки. К настоящему времени таким путем получено много различных *моноклональных антител*, которые используются в аналитических целях как высокоспецифические реагенты. Например, моноклональные антитела против определенного лекарственного средства или гормона позволяют определить его содержание в жидкостях тела даже при крайне низкой концентрации.

33.11. Каждая L- и H-цепь состоит из переменного и константного участков
При множественной миеломе в моче больных, как правило, появляются большие

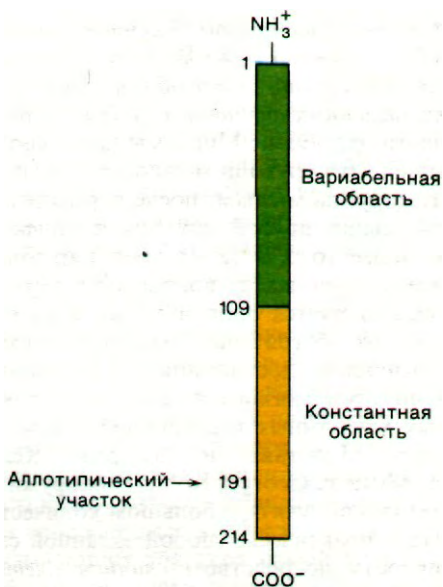


Рис. 33.12. Легкая цепь иммуноглобулина состоит из вариабельной и константной областей.



Рис. 33.13. Тяжелая цепь IgG также состоит из вариабельной и константной областей.

количества аномальных белков. На эти белки обратил внимание еще в 1847 г. Генри Бенс-Джонс (Henry Bence-Jones) в связи с их необычными свойствами: они выпадают в осадок при нагревании до 50°C и вновь растворяются при кипячении. Оказалось, что белок Бенс-Джонса - это димер L-цепей иммуноглобулина, продуцируемого миеломой больного; этот белок послужил удобным исходным материалом для анализа последовательности аминокислот в L-цепях.

В 1965 г. было проведено первое полное определение последовательностей аминокислот в миеломных L-цепях, содержащих 214 аминокислотных остатков. Эти исследования показали, что у разных больных белки Бенс-Джонса различаются по последовательности аминокислот. Самое удивительное состояло в том, что различия касались только N-концевой половины полипептидных цепей. Каждый из исследованных белков Бенс-Джонса характеризовался уникальной последовательностью аминокислот в положениях от 1 до 108, но начиная с положения 109, последовательность ряда белков Бенс-Джонса была идентичной. Следовательно, L-цепи состоят из вариабельного участка (остатки 1-108) и константного (постоянного) участка (остатки 109-214). Такое явление не имело прецедента в белковой химии.

Не все L-цепи имеют один и тот же константный участок. Существует два типа L-цепей, обозначаемых соответственно каппа (χ) и лямбда (λ), которые во многом сходны между собой. Так, оба типа L-цепей состоят из 214 остатков, содержат вариабельную N-концевую и константную C-концевую половины. Каждая из половин χ - и λ -цепей образует петлю из-за наличия внутрицепочечной дисульфидной связи. С-концевым остатком цепей обоих типов является цистеин, который участвует в образовании дисульфидного мостика с H-цепью. Наконец, χ - и λ -цепи содержат идентичные аминокислотные остатки в 40% положений, т. е. проявляют примерно такую же степень гомологии, как α - и β -цепи гемоглобина человека.

Константные участки всех χ -цепей идентичны, за исключением положения 191, где может стоять либо лейцин, либо валин. Это аллотипическое различие наследуется по классическому правилу Менделя. λ -Цепи также вариабельны по положению 191, где может стоять лизин или аргинин.

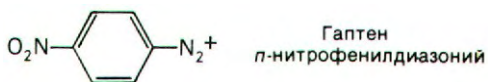
H-цепи содержат 446 аминокислотных

остатков. Сравнение последовательностей Н-цепей иммуноглобулинов, продуцируемых разными миеломами, выявило, что и в этом случае переменными оказываются первые 108 остатков (от N-конца). Следовательно, тяжелые цепи, подобно легким, состоят из *варибельной (V) и константной (C) области*. Варибельные области Н- и L-цепей по размеру одинаковы, а константные - различны: в Н-цепях этот участок в 3 раза длиннее, чем в L-цепях (рис. 33.13).

33.12. Участок связывания антигена образован гиперварибельными фрагментами L- и Н-цепей

Как уже упоминалось выше, в состав антиген-связывающего фрагмента F_{ab} полностью входит L-цепь и частично - Н-цепь. Каков относительный вклад каждой из этих цепей в связывающую активность? Первые сведения в этом отношении были получены при сравнении последовательностей аминокислот в большом числе миеломных белков. Обнаружилось, что варибельные области L- и Н-цепей вовсе не равномерно варибельны, а именно три участка L-цепи и четыре Н-цепи проявляют значительно большую изменчивость, чем другие части варибельных областей (рис. 33.14). В 1970 г. Элвин Кабат (Elwin Kabat) предположил, что эти *гиперварибельные участки* образуют область, связывающую антиген, и что именно от природы составляющих их аминокислот зависит специфичность антитела.

Для проверки этой гипотезы были проведены опыты с использованием аффинной метки. Гаптены, содержащие реакционно-способные группы, синтезируются просто. Реакционноспособный гаптен специфически связывается с антиген-связывающим участком антитела и далее образует ковалентную связь с ближайшим подходящим остатком в молекуле данного белка. Например, антитела против ДНФ можно пометить по антиген-связывающему участку гаптенем нитрофенилдиазонием:



Диазониевая группа высокореакционно-способна и образует диазосоединения с остатками тирозина, гистидина и лизина. Модифицированные таким образом антитела содержат метку и в L-цепях и в Н-цепях. При этом меченые остатки оказались лока-

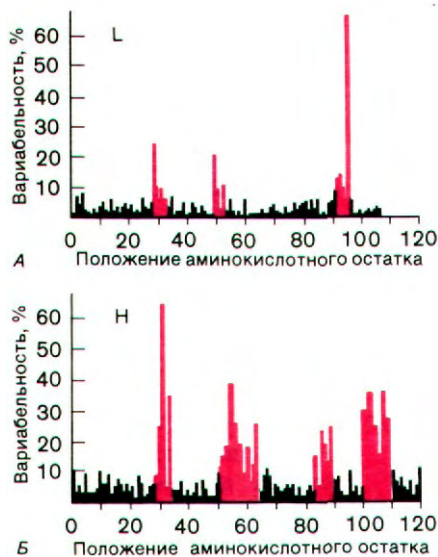


Рис. 33.14. Гиперварибельные участки легких (А) и тяжелых (Б) цепей. Степень варибельности в последовательности аминокислот отложена как функция положения аминокислоты. (Capra J. D., Edmundson A. B., The antibody combining site, Scientific American, Inc., 1976.)

лизованными в гиперварибельных участках этих цепей. Следовательно, *участки связывания антигена формируются гиперварибельными остатками аминокислот как L-цепей, так и Н-цепей*. При последующем рентгеноструктурном анализе были получены более прямые данные в пользу этого положения; мы их обсудим ниже.

33.13. Варибельная и константная области выполняют разные функции

N-концевые части легких и тяжелых цепей содержат варибельные области, ответственные за связывание антигена. Различиями в последовательности аминокислот обусловлено формирование участков, связывания антигена, различающихся по специфичности. Остальная часть каждой из цепей - константная; она осуществляет такие эффекторные функции, как связывание комплемента и перенос антител через плацентарную мембрану. Одни и те же эффекторные функции свойственны антителам

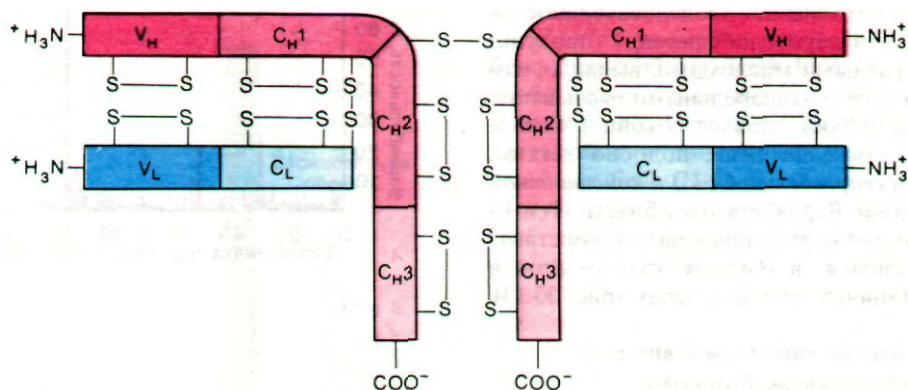


Рис. 33.15. Структура IgG. Показано расположение дисульфидных мостиков и участки гомологичных последовательностей. (Edelman G. M., The structure and function of antibodies, Scientific American, Inc., 15,70.)

самой разной специфичности. Таким образом, *антитела состоят из участка с уникальной последовательностью аминокислот, определяющей специфичность связывания антигена, и из участка с постоянной последовательностью, осуществляющего общие эффекторные функции.* Поразительная особенность структуры иммуноглобулинов состоит в том, что варибельный и константный области в легких и тяжелых цепях имеют четкую границу раздела.

33.14. Молекулы антител уложены с образованием компактных доменов, имеющих гомологичные последовательности
Последовательность аминокислот в молекуле иммуноглобулина полностью раскрыл в 1968 г. Джералд Эделман (Gerald Edelman). Самая интересная особенность этой последовательности состоит в периодичности расположения внутрицепочечных дисульфидных связей и в легких, и в тяжелых цепях (рис. 33.15). Кроме того, имеется сходство в последовательности аминокислот разных частей молекулы иммуноглобулина. Так, варибельная область легкой цепи (V_L) гомологична варибельной области тяжелой цепи (V_H); константная область тяжелой цепи (C_H) состоит из трех равных частей (C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}), обладающих сходными последовательностями; на-

конец, константная область легкой цепи (C_L) гомологична трем доменам константной области тяжелой цепи.

Эта очевидная гомология последовательностей аминокислот свидетельствует о том, что молекулы иммуноглобулинов свернуты с образованием компактных доменов, каждый из которых содержит область, гомологичную по крайней мере одному активному участку, выполняющему определенную функцию, свойственную молекуле иммуноглобулина в целом (рис. 33.16). Представляется вероятным, что домены сходны по четвертичной структуре, поскольку сходны их последовательности аминокислот. Данные рентгеноструктурного анализа подтвердили гипотезу доменов. Роберто Поляк (Roberto Poljak) раскрыл пространственную структуру при разрешении 2,0 А фрагмента F_{ab'} (практически идентичного фрагменту F_{ab}) человеческого иммуноглобулина. Фрагмент F_{ab'} состоит из *четырёх расположенных в виде тетраэдра глобулярных субъединиц - V_L, V_H, C_L и C_{H1} - поразительно сходных по пространственной структуре* (рис. 33.17). Общая структурная особенность четырех доменов состоит в наличии двух широких антипараллельных β-складок (рис. 33.18). Между ними располагаются плотно упакованные боковые цепи многих гидрофобных остатков. Указанный повторяющийся элемент структуры назван *иммуноглобулиновой складкой*.

Трёхмерную структуру интактного иммуноглобулина G раскрыл Дэвид Дэвис (David Davies). Анализ карты электронной плотности с разрешением 6 А показал, что молекула IgG имеет Т-образную форму (рис. 33.19). Домены в фрагменте F_c, также как и в фрагменте F_{ab'}, имеют характерную иммуноглобулиновую складку. Углеводный компонент, ковалентно связанный с остат-

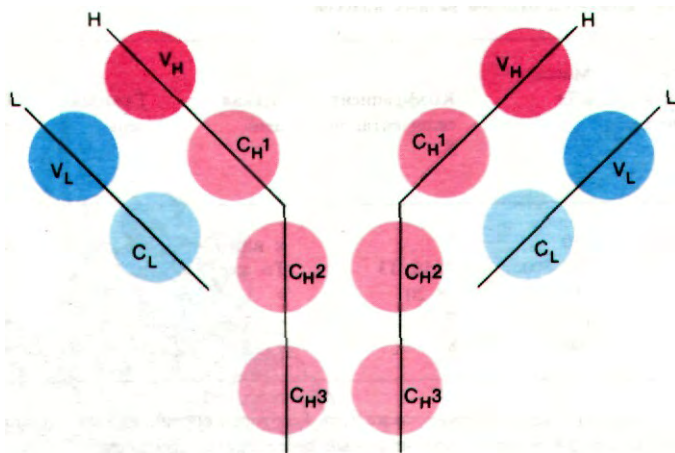


Рис. 33.16. Схема, иллюстрирующая гипотезу доменов.

ком аспарагина в C_H2 -домене, расположен между доменами C_H1 и C_H2 (рис. 33.19) и составляет значительную часть области контакта между единицами F_{ab} и F_c . Сравнение взаимной ориентации прилегающих друг к другу доменов в разных иммуногло-

булинах и их фрагментах показало, что полипептидные цепи между доменами обладают значительной гибкостью.

33.15. Рентгеноструктурный анализ связывающих участков антител показал, как происходит связывание некоторых гаптенов

Рентгеноструктурный анализ комплексов гаптенов с фрагментами F_{ab} позволил определить природу антиген-связывающих

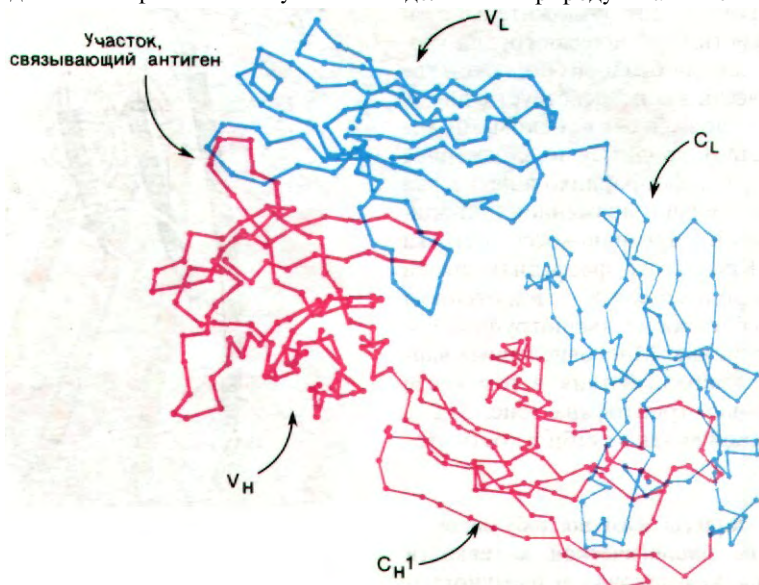


Рис. 33.17. Структура F_{ab} -фрагмента; показаны только α -углеродные атомы. L-цепи изображены синим цветом, H-цепи - красным. [Poljak R. L., Amzel L. M., Avey H. P., Chen B.L., Phizackerley R. P., Saul F., Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 3306 (1973).]

участков антител и структурную основу их специфичности. Подтвердилось предсказание, сделанное на основании сопоставления последовательностей аминокислот, а также опытов с аффинной меткой, что *антиген-*

Таблица 33.1. Свойства иммуноглобулинов разных классов¹.

Класс	Концен- трация в сыворотке, мг/мл	Масса, кДа	Коэффициент седimentации, S	Легкая цепь	Тяжелая цепь	Субъединичный состав
IgG	12	150	7	χ или λ	γ	$\chi_2\gamma_2$ или $\lambda_2\gamma_2$
IgA	3	180-500	7, 10, 13	То же	α	$(\chi_2\alpha_2)_n$ или $(\lambda_2\alpha_2)_n$
IgM	1	950	18-20	»	μ	$(\chi_2\mu_2)_5$ или $(\lambda_2\mu_2)_5$
IgD	0,1	175	7	»	δ	$\chi_2\delta_2$ или $\lambda_2\delta_2$
IgE	0,001	200	8	»	ϵ	$\chi_2\epsilon_2$ или $\lambda_2\epsilon_2$

¹ n = 1,2 или 3. IgM и олигомеры IgA содержат также цепь J, которая соединяет между собой молекулы иммуноглобулина. Секретируемый IgA имеет дополнительный секреторный компонент.

связывающий участок антитела сформирован остатками гипервариабельных областей как L-цепи, так и H-цепи. Это хорошо видно на примере связывания производного витамина K₁ (рис. 33.20). Аналогично происходит связывание фосфорилхолина в полости, выстланной остатками, принадлежащими пяти гипервариабельным сегментам: двум L-цепи и трем H-цепи (рис. 33.21). Этот гаптен наиболее прочно связывается с остатками H-цепи. Его положительно заряженная триметиламмониевая группа уходит в глубь клинообразной полости, где электростатически взаимодействует с двумя отрицательно заряженными боковыми цепями глутамата. Отрицательно заряженная фосфатная группа фосфорилхолина связывается с положительно заряженной гуанидиновой группой аргининового остатка в устье щели. Кроме того, фосфатная группа образует водородные связи с гидроксилом тирозинового остатка и с аминогруппой боковой цепи аргинина. Многочисленные вандерваальсовы взаимодействия, в том числе с боковой цепью триптофана (рис. 33.21), также вносят свой вклад в стабильность этого комплекса.

33.16. Разные классы иммуноглобулинов различаются по биологической активности
До сих пор мы рассматривали иммуноглобулин G. Однако существует 5 классов иммуноглобулинов (табл. 33.1), и все они состоят из тяжелых и легких цепей. Константные области тяжелых цепей у иммуноглобулинов разных классов неодинаковы,

тогда как легкие цепи одни и те же: либо λ , либо χ . Тяжелые цепи иммуноглобулина G называются γ -цепями, а тяжелые цепи иммуноглобулинов A, M, D и E - соответственно α -, μ -, δ - и ϵ -цепями. Различие тяжелых цепей обуславливает и различие биологических свойств у пяти классов иммуноглобулинов. Как уже упоминалось выше, *иммуноглобулин M (IgM)* - это класс антител, которые первыми появляются в сыворотке

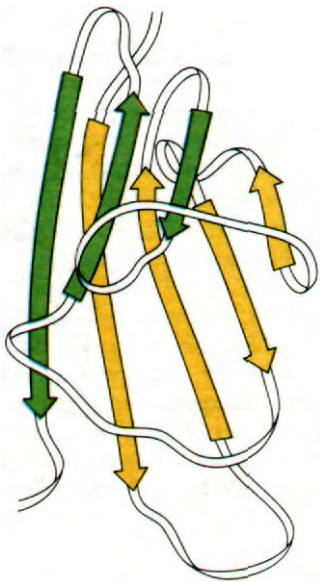


Рис. 33.18. Два слоя антипараллельных β -складок (показаны зеленым и желтым цветом) составляют основной структурный мотив доменов в иммуноглобулинах. (Capra J. D., Edmundson A. B., The antibody combining site, Scientific American, Inc., 1976.)

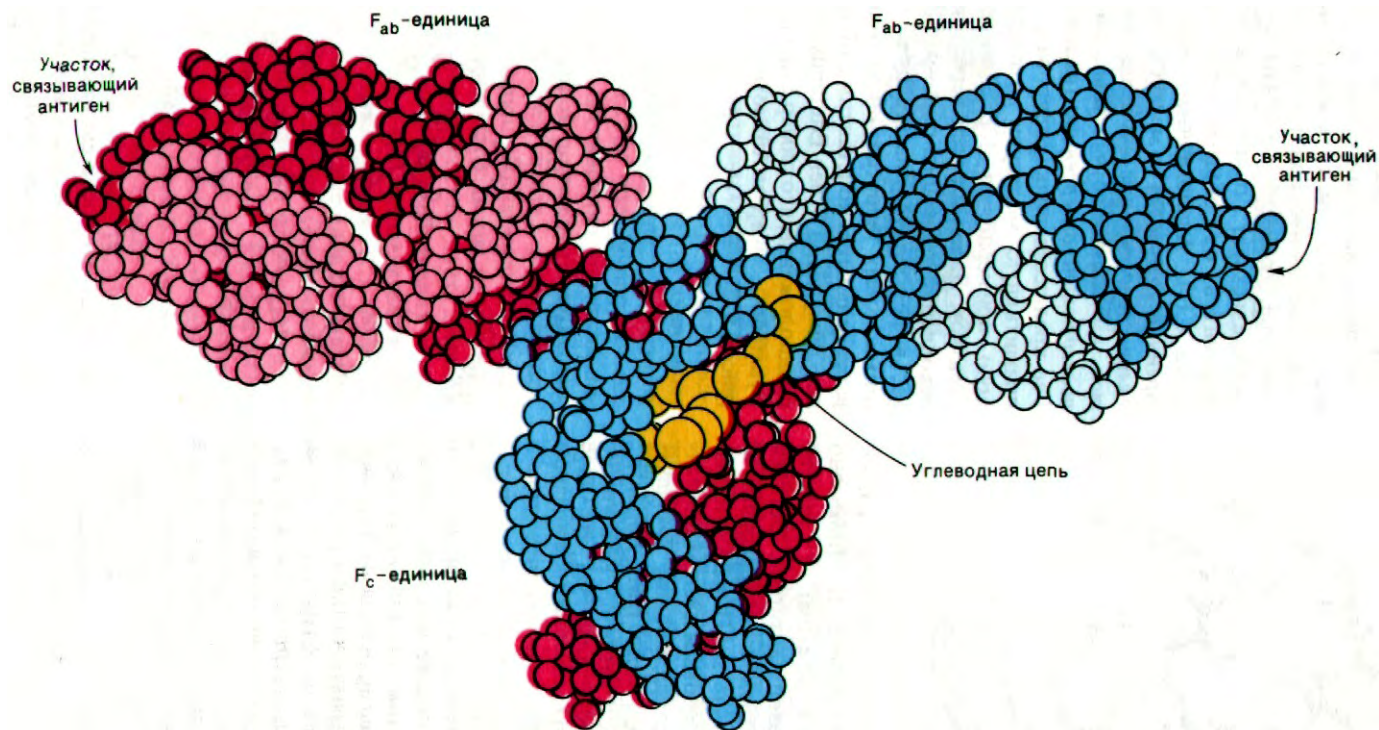


Рис. 33.19. Схематическое изображение трехмерной структуры молекулы IgG. Каждый аминокислотный остаток изображен в виде шарика. Одна из H-цепей показана красным цветом, другая синим. Одна из L-це-

пей показана розовым цветом, другая голубым. Углеводная цепь присоединена к домену C_H2 (показана желтым цветом). [Silverton E. W., Navia M.A., Davies D. R., Proc. Nat. Acad. Sci. 74, 5142 (1977).]

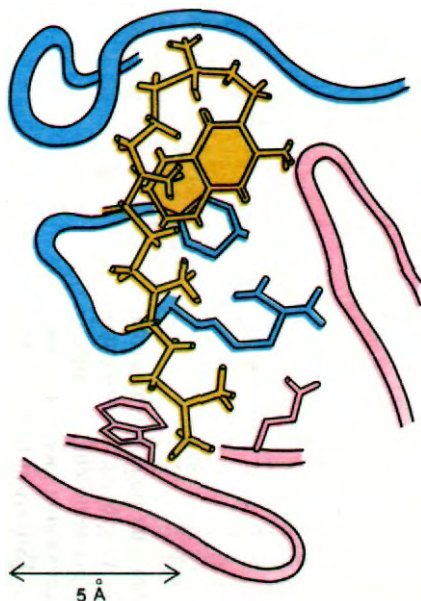


Рис. 33.20. Способ связывания производного витамина K_1 (показано желтым цветом) в участке связывания антигена. Остатки аминокислот гипервариабельного участка Н-цепи изображены розовым цветом, а остатки, принадлежащие L-цепи, — синим. [Amzel I. M., Poljak R., Saul F., Varga J., Richards F., Proc. Nat. Acad. Sci., **71**, 1427 (1974).]

после введения антигена, тогда как иммуноглобулин G (IgG) - основной класс антител сыворотки. На протяжении многих лет IgG называли γ -глобулином, исходя из его электрофоретических характеристик и растворимости. Иммуноглобулин A (IgA) - это основной класс антител, секретируемых с различного рода продуктами внешней секреции (слезная жидкость, слизь бронхального и кишечного эпителия). Таким образом, IgA служит первой линией защиты против бактериальных и вирусных антигенов. Какова функция иммуноглобулинов D (IgD) и E (IgE), пока не известно. Установлено, однако, что иммуноглобулин E опосредует аллергические реакции и тем самым оказывает вредное действие.

Часть V.

Молекулярная физиология

33.17. Молекулы антител возникли в результате дупликации и последующей дивергенции генов

Структурная гомология доменов иммуноглобулинов указывает на характер их происхождения в эволюции. Выше уже рассматривался вопрос о том, что сходство последовательностей аминокислот в молекулах химотрипсина, трипсина, эластазы и тромбина свидетельствует о происхождении этих ферментов от общего предшественника (разд. 8.11). Аналогичным образом *внутренняя гомология в молекуле иммуноглобулина свидетельствует о появлении антител в процессе дупликации генов и их последующей дивергенции* (видоизменения). Ген-предшественник кодировал, вероятно, примитивную молекулу антитела, состоящую примерно из 108 аминокислотных остатков. Далее, по всей вероятности, происходила дупликация гена-предшественника; в результате дивергенции образовавшихся новых генов возникли разные типы вариабельных и константных областей. Аллен Эдмундсон (Allen Edmundson) высказал предположение, что димер L-цепи выполнял функцию примитивного антитела (рис. 33.22).

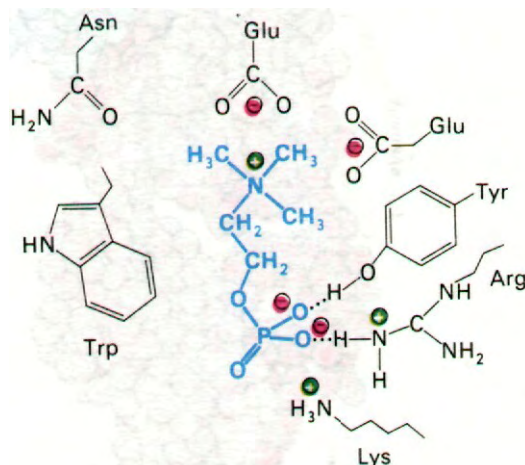


Рис. 33.21. Способ связывания фосфорилихолина (показан синим цветом) с антителом в участке, связывающем антиген. [Padlan E.A., Davies D. R., Rudikoff S., Potter M., Immunochemistry, **13**, 945 (1976).]

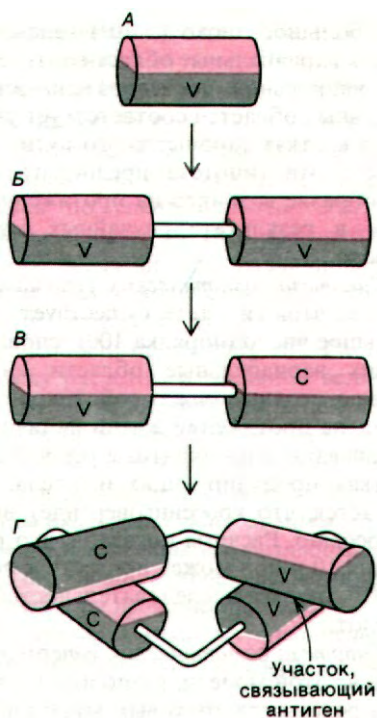


Рис. 33.22. Вероятные этапы эволюции примитивных антител. Ген, кодирующий одну полипептидную цепь (А) из 108 аминокислотных остатков, удваивается и дает два идентичных домена (Б), соединенных короткой линейной полипептидной цепью. В результате дивергентной эволюции образовавшихся при удвоении генов аминокислотный состав двух доменов становится различным и возникают (В) переменная (V) и константная (С) области, перевернутые одна по отношению к другой. При соединении этих молекул формируется (Г) примитивный F_{ab} -фрагмент, обладающий участком связывания антигена. (Capra J. D., Edmundson A. B., The antibody combining site, Scientific American, Inc., 1976.)

33.18. Варибельные и константные области кодируются разными, но соединившимися генами

Как организованы и как функционируют гены иммуноглобулина? Обнаружение четкого различия между варибельными и кон-

стантными областями в L- и H-цепях дало основание думать, что гены иммуноглобулинов, так же как и кодируемые ими полипептиды, имеют необычную архитектуру. Ранее уже упоминалось, что константные области χ -цепей идентичны по всем положениям, кроме 191, где может стоять либо лейцин, либо валин. Как показал анализ родословной, указанные два варианта (аллоти́па) наследуются в соответствии с классическим правилом Менделя, а это служит веским доводом в пользу того, что константная область χ -цепей кодируется только одним геном. Что касается варибельных областей, то по данным генетического анализа они кодируются множеством генов. В 1965 г. Уильям Дрейер и Клод Беннетт (William Dreyer, Claude Bennett) выдвинули предположение, что в половых клетках множественные гены V пространственно отделены от одиночного гена С. Согласно этой гипотезе, в процессе дифференцировки клетки, продуцирующей антитело, один из генов V соединяется с геном С. Позднее стало известно, что действительно возможно сращивание ДНК (сплайсинг), аналогичное тому, которое имеет место, например, при включении ДНК фага в геном.

Окончательная проверка этой гипотезы транслокации сможет быть произведена только после того, как будет выделена чистая мРНК иммуноглобулина и будут разработаны методы анализа сложных геномов млекопитающих. Особенно интересно в этом отношении использование рестриктаз, расщепляющих большие хромосомы на специфические фрагменты ДНК, которые нетрудно далее подвергнуть анализу. Распределение генов V и С в этих фрагментах ДНК можно определить путем гибридизации их с фрагментами мРНК, специфичными в отношении либо варибельной, либо константной области. В 1976 г. Сусуму Тонегавы (Susumu Tonegawa), используя этот подход, определил, что в ДНК половых клеток гены V и С расположены далеко друг от друга, а в клетках, продуцирующих антитела, они тесно связаны. Следовательно, в ходе дифференцировки лимфоцитов происходит перемещение генов иммуноглобулина (рис. 33.23).

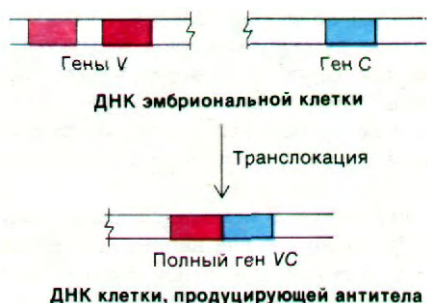


Рис. 33.23. При дифференцировке клеток, продуцирующих антитела, ген *V* транслоцируется, соединяясь с геном *C*.

33.19. Как возникает разнообразие специфичности антител?

Организм животного обладает способностью к синтезу больших количеств специфических антител спустя несколько недель после введения практически любой чужеродной детерминанты. Число различных видов антител, которые могут синтезироваться в организме животного, огромно - вероятно, оно превышает миллион. Как мы уже видели, структурной основой специфичности антител служат последовательности аминокислот в переменных областях легких и тяжелых цепей. Это подводит нас к ключевому вопросу: *каким образом возникают различные последовательности аминокислот переменных областей?* Можно сформулировать в связи с этим и более конкретные вопросы.

1. *Когда возникает разнообразие?* На протяжении жизни животного (соматически) или на протяжении эволюции (генетически)?

2. *Как возникает разнообразие?* В результате случайных мутаций в ходе эволюции, путем соматической рекомбинации или путем соматической гипермутации?

Обилие данных относительно последовательностей аминокислот миеломных иммуноглобулинов позволило иммунологам разработать несколько гипотез относительно того, как возникло разнообразие антител. Были предложены три возможных механизма.

1. *Гипотеза клеток зародышевых линий.* Согласно этой модели, разнообразие свойственно уже клеткам зародышевых линий (и эмбриональным клеткам), содержащим

очень большое число ($>10^4$) генов, кодирующих переменные области антител. Каждой уникальной последовательности переменных областей соответствует участок ДНК в клетках зародышевого пути. Таким образом, эта гипотеза предполагает, что разнообразие возникло на протяжении эволюции в результате случайных мутаций и отбора.

2. *Гипотеза соматических рекомбинаций.* Согласно этой гипотезе, существует только небольшое число (порядка 100) генов, кодирующих переменные области антител. Эти гены, сходные между собой, но не идентичные, на протяжении жизни индивидуума претерпевают многократные рекомбинации в клетках, продуцирующих антитела. Предполагается, что кроссинговер идет внутрихромосомно. Расчеты показали, что рекомбинация 10 генов может привести к появлению 10^6 разных последовательностей аминокислот.

3. *Гипотеза соматических гипермутаций.* Согласно этой модели, разнообразие возникает в результате точковых мутаций одного-единственного гена переменной области данного подкласса. Однако только необычайно высокая частота мутаций могла бы создать на протяжении жизни индивидуума все разнообразие специфичности антител. Было высказано предположение, что в клетках, продуцирующих антитела (или в соответствующих клетках-предшественниках), увеличение скорости мутаций обеспечивается механизмом репарации ДНК, действие которого в данном случае направлено на производство ошибок.

33.20. Переменные участки L- и H-цепей кодируются несколькими сотнями генов

Революция в методах изучения ДНК, произошедшая в последние годы, сделала вопрос о происхождении разнообразия антител доступным для экспериментального анализа. Особенно ценными в данном случае оказались методы клонирования генов и быстрого определения последовательности протяженных участков ДНК. Благодаря использованию этих методов за короткий срок была получена информация, необходимая для ответа на два узловых вопроса: сколько генов переменных областей содержится в клетках зародышевого пути? Меняется ли последовательность оснований в процессе дифференцировки клеток, продуцирующих антитела?

Ответ на первый вопрос сводится к тому,

что существует несколько сотен генов *вариабельных областей х-легких* (V_k) и *тяжелых цепей* (V_H). 300 генов V_k и 300 генов V_H , соединяясь в различных комбинациях (300×300), способны были бы кодировать $9 \cdot 10^4$ вариантов молекул антител, различающихся по специфичности. Этот расчетный максимум ($9 \cdot 10^4$) намного ниже реального числа антител различной специфичности, синтезирующихся в организме животного; считается, что число таких антител значительно превышает 10^6 . Расхождение между расчетом и реальной величиной еще выше в отношении легких цепей λ , которые, как было показано, кодируются менее, чем 10 генами V_k . В целом *число генов вариабельных областей в клетках зародышевого пути оказалось слишком малым, чтобы полностью обеспечить все разнообразие антител. Очевидно, в ходе дифференцировки лимфоцитов на протяжении жизни животного появляются какие-то дополнительные факторы, повышающие степень разнообразия.*

33.21. Открытие генов *J* (соединяющих) - дополнительного источника разнообразия антител

Следующий шаг в изучении механизма, обеспечивающего разнообразие антител, был сделан при определении последователь-

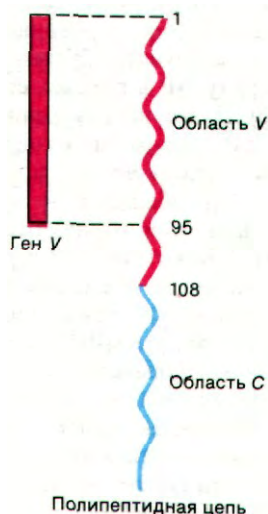


Рис. 33.24. Ген *V*, выделенный из эмбриональных клеток, укорочен. Он не кодирует последние 13 аминокислотных остатков вариабельной (V) области полипептидной цепи.



Рис. 33.25. Расположение тандемом группы генов *J*, кодирующих часть последнего гипервариабельного участка вариабельной области; гены *J* локализованы вблизи гена *C*.

ностей оснований клонированных генов, кодирующих иммуноглобулины в эмбриональных и миеломных клетках. Эти исключительно продуктивные исследования были проведены Тонегавой, Филиппом Ледером и Лероем Худом (Tonegawa, Philip Leder, Leroy Hood). Прежде всего, совершенно неожиданно выяснилось, чем в эмбриональных клетках гены *V* кодируют вариабельные области *L*- и *H*-цепей вовсе не целиком. Ген *V* эмбриональных клеток (и клеток зародышевого пути) заканчивается кодом для аминокислотного остатка 95, а не 108, который составляет конец вариабельной области полипептидной цепи иммуноглобулина (рис. 33.24). Где же находится ДНК, которая кодирует последние 13 остатков вариабельной области? В эмбриональных клетках этот отрезок ДНК локализован в неожиданном месте: вблизи гена *C*. Указанный отрезок ДНК назвали геном *J* (от англ. join - соединять), потому что в дифференцированных клетках он соединяет гены *V* и *C*. В сущности, в эмбриональных клетках вблизи гена *C* локализована целая группа расположенных тандемом генов *J* (рис. 33.25). При дифференцировке клеток, продуцирующих антитела, происходит транслокация гена *V* в участок, расположенный рядом с геном *C*; эта транслокация осуществляется путем внутривитрихромосомной рекомбинации. При этом ген *V* срачивается (сплайсинг) с геном *J* и формируется общий ген, полностью кодирующий вариабельный участок. Каждый из указанных генов содержит короткую палиндромную (разд. 24.27) последовательность, расположенную рядом с участком рекомбинации. Эти палиндромы служат, вероятно, элементами узнавания в процессе рекомбинации.

Гены *J* вносят большой вклад в разнообразие антител, так как они кодируют



Рис. 33.26. Неточность места соединения генов *V* и *J* служит еще одним источником разнообразия антител.

часть последнего гипервариабельного участка L- и H-цепей. При формировании полного гена V_h любой из нескольких сотен генов *V* может присоединиться к любому из пяти генов *J*. Например, в результате комбинации 300 неполных генов *V* с пятью генами *J* может образоваться 1500 вариантов полного (непрерывного) гена *V*. Следовательно, *соматическая рекомбинация этих генных сегментов усиливает разнообразие, заложенное уже в клетках зародышевого пути.*

33.22. Соединение генов *V* и *J* в различных рамках также способствует разнообразию антител

Второе удивительное открытие состояло в том, что набор из пяти генов *J* обеспечивал синтез не пяти, а большего числа последовательностей аминокислот для соответствующих областей легкой цепи. Анализ последовательностей аминокислот и оснований показал, что рекомбинация генов *V* и *J* происходит не абсолютно точно. Как оказалось, рекомбинация этих генов может иметь место по тому или иному из оснований вблизи кодона, детерминирующего остаток 95 (рис. 33.26). Следовательно, различие рамок, в которых происходит сращива-

ние генов *V* и *J*, вносит дополнительный вклад в разнообразие антител в организме. Похоже, что иммунная система получает удовольствие от мелких погрешностей!

В каждом данном лимфоците экспрессирован только один из двух аллельных генов. Следовательно, все участки, связывающие антиген, продуцируемые отдельной клеткой, одинаковы. Обнаружена структурная основа такого избирательного выражения гена (называемого *аллельным исключением*). Как показал анализ фрагментов, полученных после рестрикции, неполный ген *V* правильно соединяется с геном *J* только в одной из двух гомологичных хромосом; экспрессируется же только правильно рекомбинированный ген иммуноглобулина.

33.23. мРНК для L- и H-цепей образуются путем сращивания (сплайсинга) первичных продуктов транскрипции

мРНК легких χ -цепей содержит около 1250 оснований (рис. 33.27). Как и в других мРНК эукариот, в ней содержатся poly(A)-последовательность, присоединенная к 3'-концу, и нетранслируемые последовательности на 3'- и 5'-концах. *Лидерная последовательность* вблизи 5'-конца мРНК χ -цепи кодирует гидрофобную N-концевую область синтезируемой χ -цепи. Образующаяся *сигнальная последовательность* (рис. 33.28) направляет рибосому к эндоплазматическому ретикулуму и определяет способность новосинтезированной полипептидной цепи иммуноглобулина проходить через мембрану ЭР в просвет его трубочек (разд. 29.30). Далее на внутренней стороне мембраны ЭР происходит отщепление сигнальной последовательности под действием пептидазы. Вариабельная и константная области легкой цепи кодируются смежной областью мРНК, которая следует непосредственно за лидерной последовательностью.

Первичный продукт транскрипции, из которого образуется эта мРНК, содержит две вставочные последовательности (рис. 33.29). Одна из них отделяет лидерную последовательность от начала мРНК, кодирующей вариабельную область, а вторая расположена между дистальным концом последовательности, комплементарной гену *J*, и началом последовательности, комплементарной гену *C* (т.е. кодирующей константный участок). При превращении первичного продукта в мРНК (процессинг) происходит удаление этих вставочных последовательностей. Любопытно, что ген *J* несет информацию для

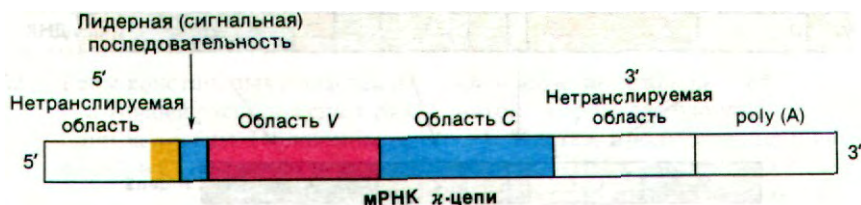


Рис. 33.27. Структура мРНК, кодирующей L-цепь.

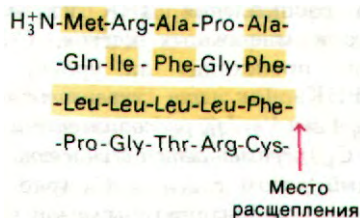


Рис. 33.28. Сигнальная последовательность новосинтезированной L-цепи. Желтым цветом отмечены гидрофобные остатки.

сплайсинга (срашивания) двух типов: одно - на уровне ДНК (слияние генов V и J) и другую - на уровне РНК (соединение J - и C -участков).

Какова структура гена, кодирующего тяжелую цепь? Вспомним, что H-цепь состоит из четырех доменов: V_H , C_H1 , C_H2 и C_H3 . Недавно было осуществлено клонирование фрагмента ДНК, определяющего константную область тяжелой цепи IgG. Электронно-микроскопические исследования показали, что C_H1 , C_H2 и C_H3 кодируются разными участками ДНК (рис. 33.30). Еще один участок ДНК кодирует шарнирное соединение между C_H1 и C_H2 . В целом доменная структура иммуноглобулинов (разд. 33.14) является отражением архитектуры соответствующих генов. Благодаря сплайсингу организмы оказались спо-

собными создавать в ходе эволюции новые белки путем объединения участков ДНК, кодирующих разные домены.

33.24. Разные классы антител образуются в результате перескока генов V_H

Как уже упоминалось, существует пять классов иммуноглобулинов. Клетки, продуцирующие антитела, сначала продуцируют IgM, а затем IgG, IgA, IgD или IgE той же самой специфичности. При этом переключении от IgM на другой класс иммуноглобулинов легкая цепь остается неизменной. Более того, неизменной остается и вариабельная область тяжелой цепи. Меняется только константная область тяжелой цепи, и потому этот этап дифференцировки клетки, продуцирующей антитела, называют C_H -переключением (рис. 33.31).

В эмбриональных клетках мыши гены, кодирующие константные области μ -, γ - и α -тяжелых цепей (и обозначаемых соответственно C_{μ} , C_{γ} и C_{α}), расположены в ряд, один за другим (рис. 33.32). Как оказалось, существует четыре гена константных участков γ -цепей, что полностью соответствует данным генетического анализа, выявившего четыре подкласса IgG. Рядом с геном C_{μ} локализуется набор расположенных тандемно генов J , кодирующих последний гипервариабельный участок вариабельной области. Полный ген тяжелой цепи IgM образуется путем транслокации гена V_H к гену J_H (рис. 33.33). В результате этой транслокации гены V_H , J_H и C_{μ} соединяются в функционально единый ген. Вставочные последовательности между лидерным отрезком и на-

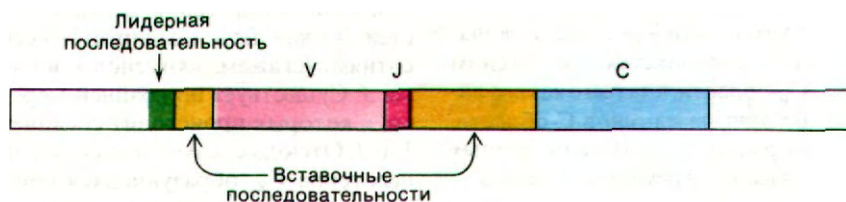


Рис. 33.29. Первичный транскрипт - предшественник мРНК L-цепи.

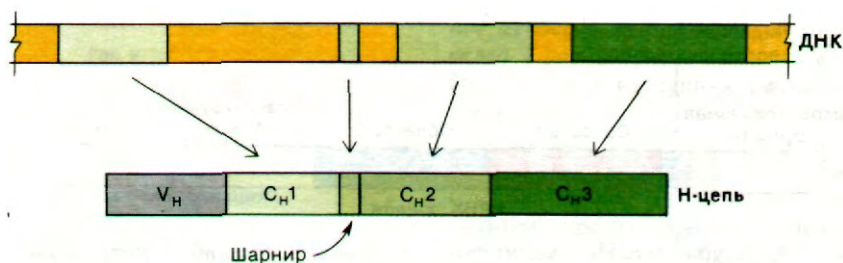


Рис. 33.30. Три домена константной (С) области тяжелой цепи и шарнирный участок кодируются разными участками гена.

чалом гена варибельной области, между концом гена J_H и началом гена C_H , а также в пределах гена C_H выстригаются в ходе превращения первичного транскрипта в мРНК для μ -цепи.

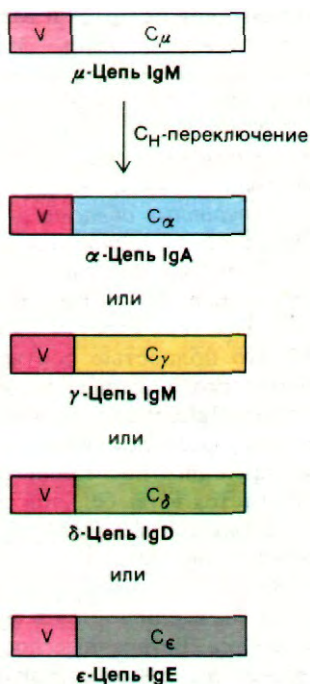


Рис. 33.31. Синтез различных классов иммуноглобулинов. В результате того, что ген V_H -области сначала соединяется с геном C_H -области, а затем с каким-либо другим из генов С-области, формируются Н-цепи разных классов иммуноглобулинов.

Как показал анализ продуктов рестриктазного расщепления ДНК из эмбриональных и миеломных клеток, C_H -переключение происходит на уровне ДНК, а не РНК. Так, при переключении от IgM к IgA ген $V_H J_H$, расположенный рядом с геном C_H , перемещается в участок, расположенный рядом с геном C_α (рис. 33.34). При этой рекомбинации гены между C_H и C_α образуют петлю и выстригаются. Не исключено, что участки ДНК, претерпевающие рекомбинацию, несут палиндромную последовательность. Именно транслокация всего гена $V_H J_H$ лежит в основе того факта, что IgA , продуцируемый определенной клеткой, идентичен по антигенной специфичности IgM , синтезированному той же клеткой на более ранней стадии развития. Каким образом клетка выбирает для транслокации один из нескольких генов C_H , остается неизвестным. Биологическое значение C_H -переключения состоит в том, что весь домен, ответственный за узнавание (варибельный домен), перемещается от первоначальной константной области (C_μ) к другим константным областям, кодирующим полипептидные цепи с иными эффекторными функциями.

33.25. Разнообразие антител обусловлено соматической рекомбинацией многих генов клеток зародышевого пути и соматической мутацией

Подытожим теперь те механизмы, которые обеспечивают разнообразие антител. Клетки зародышевого пути содержат довольно большой набор генов варибельных областей. Легкая цепь χ кодируется несколькими сотнями (скажем, 300) генов V и пятью генами J . Существует по крайней мере три рамки, в которых происходит соединение генов V и J . Отсюда следует, что общее число полных генов V_J , образующихся при всех возможных сочетаниях генов V и J , составляет $300 \cdot 5 \cdot 3 = 4500$. Подобным же путем может возникнуть аналогичное число вариантов

Гены J_H	C_μ	$C_{\gamma 3}$	$C_{\gamma 1}$	$C_{\gamma 2b}$	$C_{\gamma 2a}$	C_α
------------	---------	----------------	----------------	-----------------	-----------------	------------

Рис. 33.32. Гены константных областей μ -, γ - и α -цепей расположены в ряд, один за другим. Положение генов C_δ и C_ϵ еще не установлено.

тяжелых цепей. Соединение 4500 L-цепей с 4500 H-цепями дает $4500 \cdot 4500 = 2 \cdot 10^7$ различных по антигенной специфичности антител. Это число достаточно велико, чтобы обеспечить то большое разнообразие антител, которое образуется в организме животного.

Как упоминалось выше, генов V_L гораздо меньше, чем генов V_H . Так, у мышей имеется, по-видимому, только 2 гена V_L . Однако соответствующих этому гену последовательностей аминокислот обнаружено намного больше. Представляется вероятным, что разнообразие легких цепей λ возникает в результате соматических мутаций. *В целом, как мы видим, природа использует каждый из трех обсуждавшихся выше (разд. 33.19) источников разнообразия - большой набор генов клеток зародышевого пути, соматические рекомбинации и соматические мутации: в итоге возникает тот богатейший набор антител, который необходим для защиты организма от вторжения чужеродных веществ.*

33.26. Клонально-селекционная теория образования антител

В 50-х годах Нилс Ерне, Макферлейн Бёрнет, Дэвид Тэлмедж и Джошуа Ледерберг (Niels Jerne, Macfarlane Burnet, David Talmage, Joshua Lederberg) разработали клонально-селекционную теорию, дающую обобщенное описание иммунного ответа.

Основные положения этой ныне общепринятой теории следующие.

1. Клетка, продуцирующая антитела, содержит ДНК с уникальной последовательностью оснований, определяющей последовательность аминокислот, характерную для синтезируемых ею цепей иммуноглобулина. Специфичность антитела целиком определяется последовательностью аминокислот.

2. Каждая отдельная клетка продуцирует антитела только одной специфичности. *Следовательно, способность к синтезу определенного антитела заложена в клетке еще до контакта с антигеном.*

3. Начинаящая созревать клетка продуцирует небольшие количества антител одной специфичности. Часть из них прикрепляется к поверхности клетки. Если такая незрелая клетка встречается с антигеном, против которого оказались направлены ее антитела, то она погибает. Вследствие этого животное обычно не производит антител против собственных макромолекул, т. е. оно обладает *толерантностью к своему*. Действительно, клетки, продуцирующие антитела против собственных антигенов, элиминируются на протяжении эмбрионального развития. *На зрелые клетки в отличие от незрелых встреча с антигеном действует стимулирующим образом: усиливается синтез антител и запускается клеточное деление.* Потомки одной клетки составляют клон, обладающий всеми генетическими особенностями исходной клетки. Следовательно, деление клетки, инициированное контактом с антигеном, приводит к появлению клона клеток, синтезирующих антитела той же специфичности.

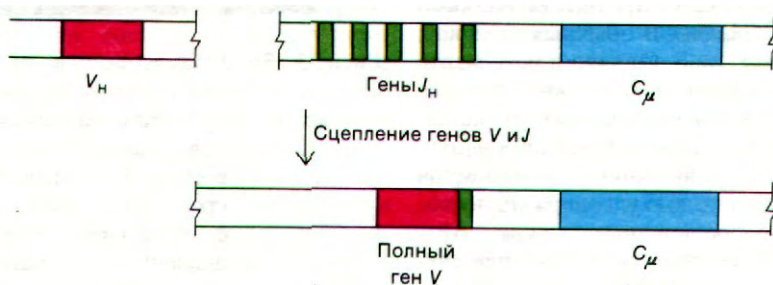


Рис. 33.33. В результате соединения генов V_H и J_H образуется ген, кодирующий μ -цепь.

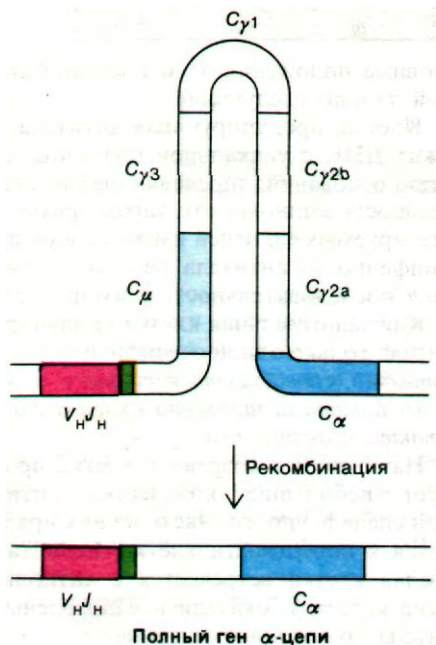


Рис. 33.34. Структурная основа C_H -переключения. В результате внутрихромосомной рекомбинации ген $V_N J_N$, находившийся возле гена C_{μ} , оказывается рядом с геном C_{α} .

4. Клон проявляет тенденцию к сохранению и после исчезновения антигена. В случае нового появления того же антигена происходит стимуляция этих клеток, что и обуславливает *иммунологическую память*.

33.27. На поверхности клеток, продуцирующих антитела, имеются рецепторы антигенов

Молекулы специфических антител расположены на поверхности продуцирующих их клеток. Клетками-предшественниками являются *лимфоциты*. В обычных условиях они делятся медленно. Однако в результате стимуляции антигеном лимфоцит превращается в *плазматическую клетку*, очень активно синтезирующую и продуцирующую антитела. Если популяцию лимфоцитов пропустить через колонку, содержащую ковалентно присоединенные динитрофенильные (ДНФ) группы, то на колонке свяжется только очень небольшая часть клеток,

а именно те, которые синтезируют антитела против ДНФ и несут молекулы таких антител на своей поверхности. Не задержавшиеся на колонке лимфоциты таких антител против ДНФ не вырабатывают.

Как происходит стимуляция лимфоцитов под действием специфических антител? В отсутствие антигена молекулы антител на поверхности лимфоцита распределены случайным образом. Добавление антигена оказывает поразительный эффект: расположенные на поверхности лимфоцита антитела вместе с присоединенными антигенами собираются вместе на одном конце клетки, образуя так называемый «колпачок» («кэп»). По завершении перераспределения молекулы антител оказываются внутри клетки. *Образование «колпачка»* идет с потреблением энергии и при участии сократительных элементов клетки. Итак, формирование на поверхности клетки решетки из комплексов антиген—антитело ведет к образованию «колпачка», а это стимулирует клеточное деление. Антиген должен быть поливалентным (т. е. содержать более одной специфической детерминанты) для того, чтобы создать перекрестные связи между молекулами антител на поверхности лимфоцита. Вопрос о зависимости митотической активности клеточного ядра от этих событий,

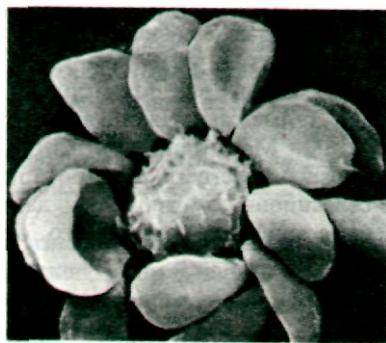


Рис. 33.35. Полученное в сканирующем электронном микроскопе изображение бараньих эритроцитов, связавшихся с человеческим Т-лимфоцитом (в центре). Поверхность этого лимфоцита имеет рецепторы, специфичные в отношении компонентов бараньих эритроцитов. (Печатается с любезного разрешения д-ра J. Thornthwaite, д-ра R. Life и д-ра M. Cayer.)

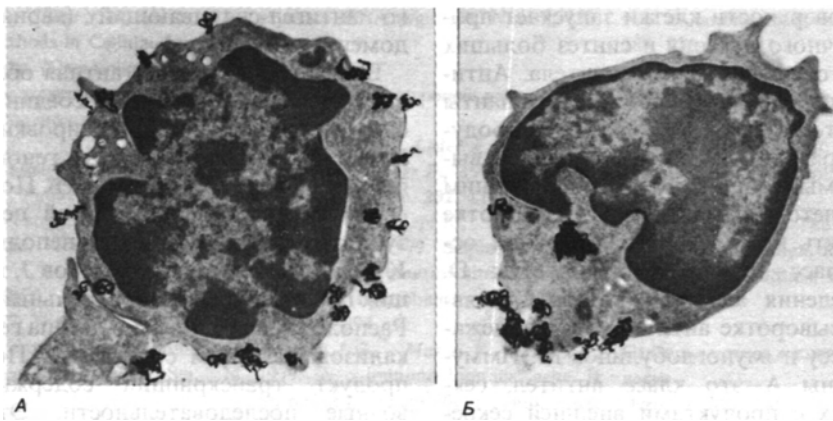


Рис. 33.36. Полученное методом радиоавтографии изображение иммуноглобулинов, образовавших «колпачок» на поверхности В-лимфоцита. Темные включения - меченные ^{125}I антитела против иммуноглобулинов, добавленные к В-лимфоцитам из селезенки мыши. *А* - при 4°C молекулы иммуноглобулинов равномерно распределяются на поверхности клетки; *Б* - после инкубации при 37°C метка концентрируется в виде «колпачка» на одном полюсе клетки и затем попадает внутрь посредством эндоцитоза. (Печатается с любезного разрешения д-ра Е. Unanue.)

разыгрывающихся на поверхности клетки, составляет интересную и важную область исследований.

33.28. Биологическое значение клональной селекции

Сущность теории селекции клонов в формулировке Бёрнета состоит в следующем:

Ни один участок связывания антигена не адаптирован в эволюционном смысле в какой-либо определенной антигенной детерминанте. Структура участка, связывающего антиген, существует как таковая, и если она оказывается подходящей в том смысле, что сродство к данной антигенной детерминанте превышает какой-то определенный уровень, то инициируется иммунологически значимая реакция.

Отбор предсуществующих вариантов, возникающих случайным образом, - это не

новая тема в биологии. В самом деле, в этом суть теории Дарвина. Любопытно отметить, что инструктивные теории предшествуют селекционным теориям: теория Ламарка предшествовала теории Дарвина, инструктивная теория в иммунологии была сформулирована раньше, чем клонально-селекционная теория.

Ерне высказал предположение, что механизмы отбора могут играть роль в функционировании нервной системы, например в механизмах памяти. По существу, инструктивная и селекционная теории обучения были сформулированы очень давно. Локк (Lock) считал, что мозг человека подобен чистому листу бумаги, на котором опыт выписывает почти бесконечные узоры. Сократ, напротив, утверждал, что «все обучение - это напоминание о том, что уже существует в мозгу». Будем надеяться, что эта глава вам кажется чем-то давно знакомым!

Заключение

Антитело - это белок, который синтезируется в организме животного в ответ на проникновение чужеродного макромолекулярного соединения (называемого антигеном или иммуногеном) и который обладает высоким сродством к нему. Небольшие чужеродные молекулы (гаптены) вызывают образование специфических антител только в том случае, если такие гаптены присоединены к макромолекулам. Синтез антител определяется действием отбора, а не инструкции. Антиген связывается на поверхности тех лимфоцитов, которые исходно синтезируют антитела, специфичные к данному антигену. Присоединение антигена к рецеп-

тору на поверхности клетки запускает процесс клеточного деления и синтез больших количеств специфического антитела. Антитела против специфической детерминанты обычно гетерогенны, поскольку они продуцируются разными клетками. Антитела, вырабатываемые одной клеткой или одним клоном клеток, гомогенны. В сыворотке имеется пять классов антител, причем основной класс - это иммуноглобулины D. После введения антигена первыми появляются в сыворотке антитела, принадлежащие к классу иммуноглобулинов M. Иммуноглобулины A - это класс антител, секретируемых с продуктами внешней секреции. Роль иммуноглобулинов D и E пока еще не установлена.

Антитела состоят из легких (L) и тяжелых (H) цепей. Иммуноглобулин G, имеющий субъединичную структуру L_2H_2 , содержит два участка связывания антигена. При ферментативном расщеплении иммуноглобулина G образуются два F_{ab} -фрагмента, которые связывают антиген, но не дают с ним осадка, а также один F_c -фрагмент, обладающий функцией эффектора (в частности, связывает комплемент). Сравнение последовательностей аминокислот в миеломных иммуноглобулинах показало, что L- и H-цепи состоят из вариабельной (V) области (N-концевая последовательность, обычно из 108 остатков) и константной (C) области. Участки связывания антигена сформированы из остатков аминокислот, принадлежащих гипервариабельным участкам вариабельных областей как L-, так и H-цепей. Молекулы антител свертываются в компактные домены, содержащие примерно по 108 аминокислотных остатков в виде гомологичных последовательностей. Полагают, что домены константной области, выполняющие эффекторные функции, возникли в процессе эволюции путем удвоения и последующего расхождения гена, кодирующе-

го антиген-связывающий (вариабельный) домен.

Вариабельная и константная области кодируются разными генами, соединяющимися в процессе дифференцировки клеток. Имеется несколько сотен генов вариабельных участков L- и H-цепей. Полный ген вариабельного участка легкой цепи образуется путем рекомбинации неполного гена V и одного из нескольких генов J , кодирующих последний гипервариабельный участок. Расположенная тандемно группа генов J локализована рядом с геном C . Первичный продукт транскрипции содержит вставочные последовательности. Эти вставочные последовательности удаляются, и в результате образуется мРНК, кодирующая вариабельные и константные области иммуноглобулина, а также N-концевую гидрофобную сигнальную последовательность, которая в последующем отщепляется от новосинтезированной полипептидной цепи. Синтез тяжелой μ -цепи IgM кодируется полным геном, также образовавшимся в результате сращивания генов V и J . Тяжелые цепи иммуноглобулинов других классов (в частности IgG) синтезируются после транслокации полного гена V_H к другому гену C (C_γ). Этот перескок генов называется C_H -переключением. Разнообразие легких х-цепей, а также тяжелых цепей обусловлено соматической рекомбинацией довольно большого числа гаметных генов (т.е. генов клеток зародышевого пути) вариабельных областей и участков соединения. Степень разнообразия возрастает также в результате соединения генов в различных рамках. Разнообразие легких цепей обусловлено, помимо соматическими мутациями. Сочетание нескольких тысяч видов L-цепей с таким же количеством видов H-цепей обеспечивает то огромное число различных антител, которое синтезируется в организме животного.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Capra J.D., Edmundson A.B., 1977. The antibody combining site, Sci. Amer., 236(1), 50-59.
Milstein C., 1980. Monoclonal

antibodies, Sci. Amer., 243(4), 66-74.
Porter R.R., 1973. Structural studies of immunoglobulins, Science, 180, 713-716.
Edelman G.M., 1973. Antibody structure and molecular immunology, Science, 180, 830-840.

Книги

Hood L.E., Weissman I.L., Wood W.B., 1978. Immunology, Benjamin. (Ясное, легко читаемое изложение основ иммунологии.)
Kabat E.A., 1976. Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry, (2nd ed.), Holt, Rinehart, and Winston. (Прекрасное описание структуры иммуноглобулинов и ее связи со специфичностью связывания антигенов.)

Mishell B.B., Shiigi S.M. (eds.), 1980. Selected Methods in Cellular Immunology, Freeman. (Очень хорошее руководство по экспериментальным методам в иммунологии.)

Структура иммуноглобулинов

Amzel L.M., Poljak R.J., 1979. Three-dimensional structure of immunoglobulins, Ann. Rev. Biochem., **48**, 961-967.

Silverton E.W., Navia M.A., Davies D.R., 1977. Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin, Proc. Nat. Acad. Sci., **74**, 5140-5144.

Valentine R.C., Green N.M., 1967. Electron microscopy of an antibody-hapten complex, J. Mol. Biol., **27**, 615-617.

Архитектура генов

Tonegawa S., Maxam A.M., Tizard R., Bernard O., Gilbert W., 1978. Sequence of a mouse germ-line gene for a variable region of an immunoglobulin light chain, Proc. Nat. Acad. Sci., **75**, 1485-1489.

Sakano H., Rogers J.H., Huppi K., Brack C., Traunecker A., Maki R., Wall R., Tonegawa S., 1979. Domains and the hinge region of an immunoglobulin heavy chain are encoded in

separate DNA segments, Nature, **277**, 627-633.

Механизмы, создающие разнообразие антител

Seidman J.G., Leder A., Nau M., Norman B., Leder P., 1978. Antibody diversity, Science, **202**, 11-17.

Sakano H., Huppi K., Heinrich G., Tonegawa S., 1979. Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes, Nature, **280**, 288-294.

Seidman J.G., Max E.E., Leder P., 1979. A χ -immunoglobulins gene is formed by site-specific recombination without further somatic mutation, Nature, **280**, 370-375.

Schilling J., Clevinger B., Davie J.M., Hood L., 1980. Amino acid sequence of homogeneous antibodies to dextran and DNA rearrangements in heavy chain V-region gene segments, Nature, **283**, 35-40.

Kataoka T., Kawakami T., Takahashi N., Honjo T., 1980. Rearrangement of immunoglobulin γ^1 -chain gene and mechanism for heavy-chain class switch, Proc. Nat. Acad. Sci., **77**, 919-923.

Davis M.M., Calame K., Early P.W., Livant D.L., Joho R., Weissman I.L., Hood L., 1980. An immunoglobulin heavy-chain gene is formed by at least

two recombinational events, Nature, **283**, 733-739.

Эффекторные функции иммуноглобулинов

Porter R.R., Reid K.B.M., 1978. The biochemistry of complement, Nature, **275**, 699-704.

Metzger H., 1978. The IgE-mast cell system as a paradigm for the study of antibody mechanisms, Immunol. Rev., **41**, 186-199.

Селекция клонов и клеточная иммунология

Burnet F.M., 1959. The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity, Cambridge University Press.

Jerne N.K., 1967. Antibodies and learning: selection versus instruction. In: Quarton G.C., Melnechuk T. and Schmitt F.O. (eds.), The Neurosciences: A Study Program, Rockefeller University Press.

Cunningham B.A., 1977. The structure and function of histocompatibility antigens, Sci. Amer., **237**(4), 96-107.

Raff M.C., 1976. Cell-surface immunology, Sci. Amer., **234**(5), 30-39.

Jerne N.K., 1973. The immune system, Sci. Amer., **229**(1), 52-60.

ГЛАВА 34

Мышечное сокращение и подвижность клеток

Каким образом энергия химических связей трансформируется в координированное движение? Это один из самых острых вопросов современной молекулярной биологии. Направленное движение имеет место при расхождении хромосом в процессе клеточного деления, при внедрении ДНК бактериофага в бактериальную клетку, при биении ресничек и жгутиков, при активном транспорте молекул, при перемещении РНК в ходе белкового синтеза и - в наиболее очевидной форме - при мышечном сокращении. В данной главе мы будем рассматривать главным образом структурную основу процесса сокращения поперечнополосатых мышц позвоночных, поскольку этот процесс изучен наиболее полно. Сократительная система поперечнополосатой мышцы состоит из перекрывающихся белковых нитей, которые скользят относительно друг друга. Сокращение происходит за счет энергии, высвобождающейся при гидролизе АТФ. В поперечнополосатой мышце оно зависит от концентрации Ca^{2+} , которая в свою очередь регулируется саркоплазматическим ретикулом - специализированной системой мембран, накапливающей Ca^{2+} в состоянии покоя и высвобождающей его при воздействии на мышечное волокно нервного импульса.

34.1. Мышца состоит из взаимодействующих друг с другом толстых и тонких белковых нитей

Произвольные мышцы позвоночных в световом микроскопе выглядят *поперечно исчерченными* (рис. 34.1). Они состоят из кле-

ток, окруженных электровозбудимой мембраной - *сарколеммой*. Мышечная клетка содержит большое число параллельных *миофибрилл* диаметром около 1 мкм каждая. Миофибриллы погружены во внутриклеточную жидкость, называемую *саркоплазмой*. В саркоплазме имеются гликоген, АТФ, фосфокреатин и гликолитические ферменты. В активно функционирующих мышцах обнаруживается также много митохондрий, регулярно расположенных вдоль миофибрилл.

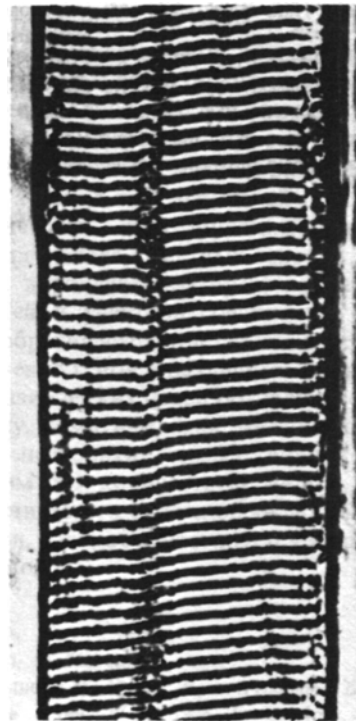


Рис. 34.1. Волокно скелетной мышцы в фазово-контрастном световом микроскопе. Диаметр волокна около 50 мкм. А-диски — темные, I-диски - светлые. (Печатается с любезного разрешения д-ра Hugh Huxley.)

Электронная микрофотография продольного среза миофибрилл выявляет множество деталей структуры (рис. 34.2 и 34.3). Функциональной единицей является *саркомер*, который повторяется каждые 2,3 мкм (23 000 А) по длинной оси фибриллы. Регулярно чередуются темная полоса - *А-диск* и светлая полоса - *І-диск*. Середина А-диска, называемая *зоной Н*, отличается меньшей электронной плотностью. По центру зоны Н проходит темная *М-линия*. І-диск пересекается узкой *Z-пластинкой* высокой электронной плотности.

О молекулярном устройстве саркомера в толщину можно судить по электронным микрофотографиям поперечного среза через миофибриллу. На них видны *два типа взаимодействующих друг с другом белковых нитей (миофиламентов)*. Диаметр *толстых нитей* равен примерно 150 А, а диаметр тонких - около 70 А. Толстые нити содержат главным образом *миозин*, тонкие - *актин*, *тропомиозин* и *тропонин*. В *Z-пластинке* имеется α -актинин, а в *М-линиях* - *М-белок*.

І-диск состоит только из тонких нитей, тогда как в зоне Н А-диска присутствуют только толстые нити. В других частях А-диска присутствуют нити обоих типов. На поперечном срезе четко видно гексагональное устройство миофибриллы, при котором каждая тонкая нить соседствует с тремя толстыми, а каждая толстая нить окружена шестью тонкими (рис. 34.3). Взаимодействие толстых и тонких нитей осуществляется с помощью *поперечных мостиков*, которые представляют собой домены молекул миозина. Поперечные мостики, с регулярными интервалами выступающие на толстых нитях, перекрывают промежуток шириной 130 А между поверхностью толстых и тонких нитей (рис. 34.4 и 34.5). По существу, именно взаимодействие миозиновых поперечных мостиков с единицами актина в тонких нитях генерирует силу сокращения.

34.2. При мышечном сокращении происходит скольжение толстых и тонких нитей относительно друг друга

Когда мышца сокращается, степень ее укорочения может достигнуть $\frac{1}{3}$ первоначальной длины. С чем это связано? В 50-х годах две группы исследователей независимо друг от друга постулировали, исходя из данных дифракции рентгеновских лучей, световой и электронной микроскопии, модель мы-

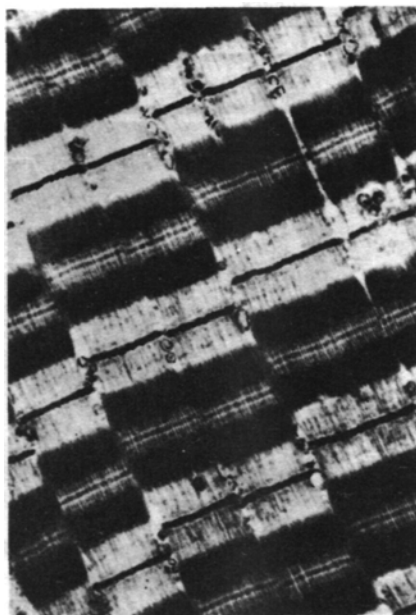


Рис. 34.2. Электронная микрофотография продольного среза волокна скелетной мышцы. (Печатается с любезного разрешения д-ра Hugh Huxley.)

шечного сокращения, получившую название *модель скользящих нитей*. Основные черты этой модели (рис. 34.6), выдвинутой Эндрью Хаксли и Р. Нидергерке (Andrew Huxley, R. Niedergerke), а также Хью Хаксли и Джейн Хенсон (Hugh Huxley, Jean Hanson), заключаются в следующем.

1. Длина как толстых, так и тонких нитей в ходе мышечного сокращения не меняется.

2. В то же время длина саркомера при сокращении уменьшается вследствие того, что нити двух типов перекрываются в большей степени, а именно *в ходе сокращения толстые и тонкие нити скользят относительно друг друга*.

3. Сила сокращения генерируется в результате активного движения нитей одного типа вдоль прилегающих нитей другого типа.

В пользу этой модели свидетельствуют данные, полученные при измерении длины А- и І-дисков, а также зоны Н в растянутой, покоящейся и сократившейся мышце (рис. 34.6). А-диск характеризуется постоян-

34. Мышечное сокращение и подвижность клеток

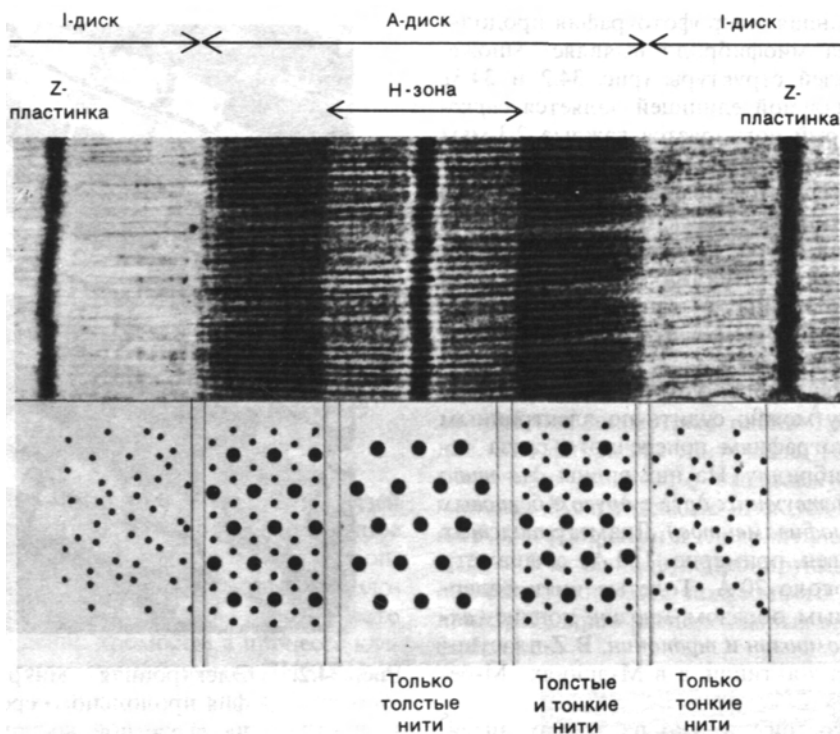


Рис. 34.3. Электронограмма продольного среза миофибриллы скелетной мышцы. Под микрофотографией приведено схематическое изображение соответствующих поперечных срезов. (Печатается с любезного разрешения д-ра Hugh Huxley.)

ной длиной, т. е. размер толстых нитей при сокращении не меняется. Расстояние между Z-пластинкой и началом ближайшей к ней зоны Н также постоянно; следовательно, и размер тонких нитей не меняется при сокращении. Однако зона Н и I-диск при сокращении становятся уже, поскольку в сократившемся волокне толстые и тонкие нити перекрываются в большей мере, чем в покоей мышце.

34.3. Миозин образует толстые нити; он гидролизует АТФ и связывает актин
Миозин обладает тремя биологически важными функциями. Во-первых, при физиологических значениях ионной силы и pH молекулы миозина в растворе спонтанно образуют волокна. По существу, *толстые*

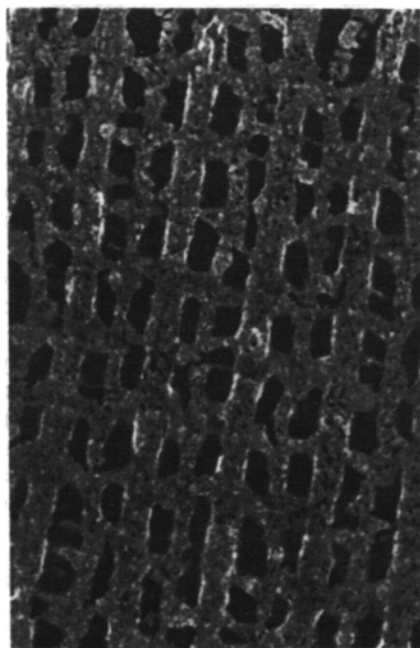


Рис. 34.4. Вид поперечных мостиков между толстыми и тонкими нитями под электронным микроскопом. (Печатается с любезного разрешения д-ра John Heuser.)

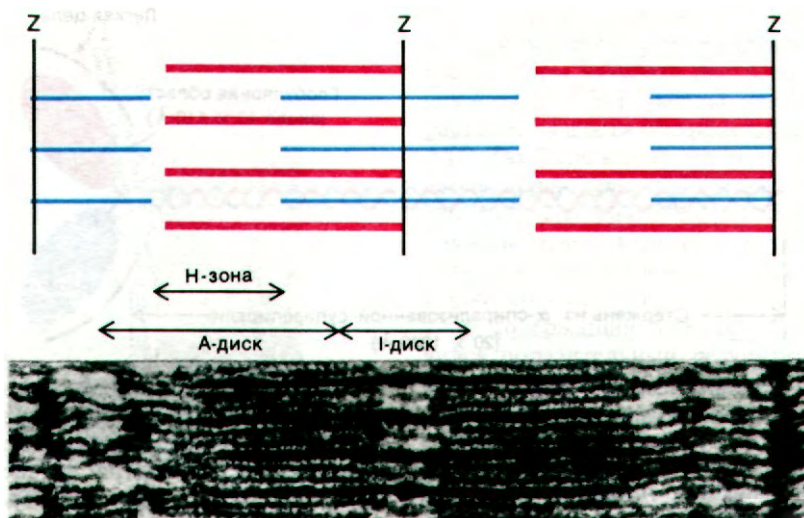


Рис. 34.5. Схематическое изображение структуры поперечнополосатой мышцы, показывающее взаимное перекрывание толстых и тонких нитей, и соответствующая электронная микрофотография сверхтонкого продольного среза. (Печатается с любезного разрешения д-ра Hugh Huxley.)

нити миофибрилл состоят в основном из молекул миозина. Во-вторых, миозин - это фермент. В 1939г. В. А. Энгельгардт и М. Н. Любимова обнаружили, что миозин обладает АТФ-азной активностью:



Эта реакция является непосредственным источником свободной энергии, необходимой для мышечного сокращения. В-третьих,



Рис. 34.6. Модель скользящих нитей. (Huxley H. E., The mechanism of muscular contraction, Scientific American, Inc., 1965.)

миозин связывает полимеризованную форму актина - основного компонента тонких нитей. Именно это взаимодействие играет ключевую роль в генерировании силы, обеспечивающей смещение толстых и тонких нитей относительно друг друга.

Молекула миозина очень большая (500 кДа). Она состоит из двух идентичных основных цепей (по 200 кДа) и четырех легких цепей (примерно по 20 кДа). На электронных микрофотографиях видно, что миозин состоит из глобулярной, образующей две головки части, присоединенной к очень длинному стержню (рис. 34.7 и 34.8). Стержень представляет собой двухцепочечную α -спирализованную суперспираль.

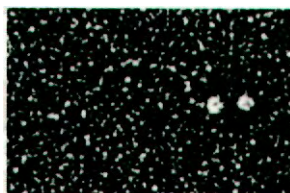


Рис. 34.7. Электронная микрофотография молекулы миозина. (Печатается с любезного разрешения д-ра Susan Lowey.)

34. Мышечное сокращение и подвижность клеток

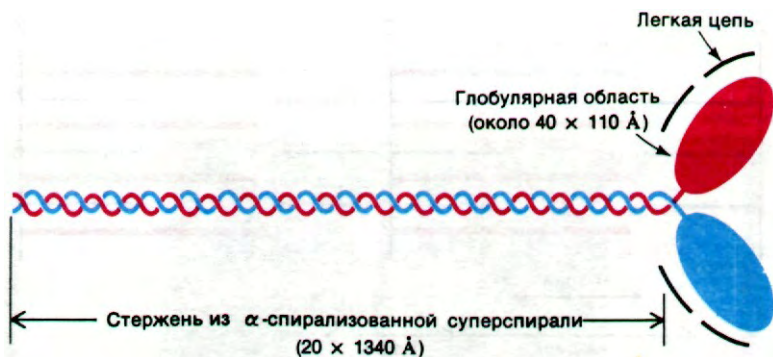


Рис. 34.8. Схематическое изображение молекулы миозина.

34.4. Миозин можно расщепить на активные фрагменты

Если миозин подвергнуть ферментативному расщеплению, то образуются фрагменты, сохраняющие некоторые функции интактной молекулы. Выше на примере иммуноглобулинов (разд. 33.5) уже было показано, насколько плодотворен такой экспериментальный подход при изучении макромолекул. На самом же деле этот подход был разработан для миозина раньше, чем для иммуноглобулинов. В 1953 г. Эндрю Сент-Дьёрдьи (Andrew Szent Gyorgyi) показал, что при обработке трипсином миозин расщепляется на два фрагмента, названные им *легким меромиозином* и *тяжелым меромиозином* (рис. 34.9).

Легкий меромиозин (ЛММ), подобно миозину, образует нити. Однако он не обладает АТФ-азной активностью и не связывает актина. На электронных микрофотографиях видно, что ЛММ имеет форму стержня; удлиненность структуры обуславливает высокую вязкость растворов ЛММ. Данные определения оптического вращения показали, что 90% молекулы ЛММ имеет структуру α-спирали. Это подтверждалось и при анализе дифракции рентгеновских лучей; волокна ЛММ дают сильный рефлекс при 5,1 Å, характерный для α-спирализованных суперспиралей. В целом, как было установлено, ЛММ представляет собой *двухцепочечный α-спирализованный стержень длиной 850 Å*.

Тяжелый меромиозин (ТММ) обладает совершенно иными свойствами. ТММ катализирует гидролиз АТФ и связывает актин,

но не способен к образованию волокон. ТММ состоит из вытянутой стержневидной части и глобулярной (в виде двух головок) области (рис. 34.9). При дальнейшем ферментативном расщеплении ТММ распадается на два глобулярных субфрагмента (обозначаемых S1) и один фибриллярный субфрагмент (S2). *Каждый S1-фрагмент имеет участок с АТФ-азной активностью и участок связывания актина*. Кроме того, к S1-фрагменту присоединены легкие цепи миозина. *Легкие цепи способны модулировать АТФ-азную активность миозина*. Так, например, в гладких мышцах ими опосредовано регулирующее действие Ca^{2+} на сокращение.

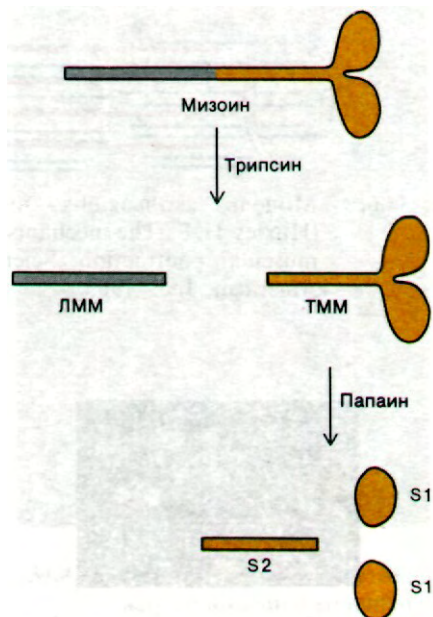


Рис. 34.9. Ферментативное расщепление миозина. На схеме не показаны 4 легкие цепи.



Рис. 34.10. Электронная микрофотография нити из очищенного F-актина. (Печатается с любезного разрешения д-ра James Spudich.)

34.5. Актин образует нити, которые соединяются с миозином

Актин - основной компонент тонких нитей. В растворах с низкой ионной силой актин существует в виде мономера массой 42 кДа, обозначаемого как *G-актин* (G от англ. globular - глобулярный). При повышении ионной силы до физиологического уровня G-актин полимеризуется в *F-актин* - фибриллярную форму, очень похожую на тонкие нити. На электронных микрофотогра-

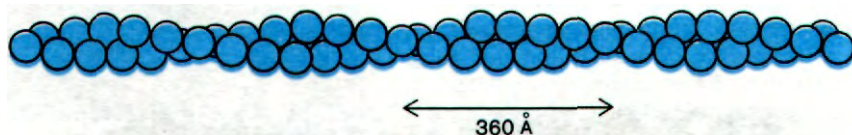


Рис. 34.11. Схематическое изображение F-актина, состоящего из спирально расположенных мономеров актина. (По схеме, любезно предоставленной д-ром James Spudich.)

фиях волокна F-актина выглядят как две нити бус, закрученные одна вокруг другой (рис. 34.10). Рентгеноструктурный анализ показал, что *F-актин представляет собой спираль из мономеров актина*. Диаметр спирали - около 70 Å. Структура состоит из повторяющихся участков длиной 360 Å по оси спирали (рис. 34.11).

При добавлении раствора актина к раствору миозина образуется комплекс

этих белков *актомиозин*. Формирование этого комплекса сопровождается большим увеличением вязкости раствора. В 40-х годах Альберт Сент-Дьёрдьи показал, что возрастание вязкости обращается добавлением АТР. Так было выявлено, что АТР вызывает *диссоциацию актомиозина* на актин и миозин. Сент-Дьёрдьи получил также нити актомиозина, молекулы которого были ориентированы определенным образом током жидкости. Когда эти нити поместили в раствор, содержащий АТР, K^+ и Mg^{2+} , получился поразительный результат: *актомиозиновые нити сократились*. В тех же условиях нити, образованные из одного миозина, не сокращались. *Эти замечательные опыты дали основание думать, что мышечное сокращение возникает в результате взаимодействия миозина, актина и АТР.*

34.6. Актин повышает АТР-азную активность миозина

АТР-азная активность миозина значительно возрастает в присутствии стехиометрических количеств F-актина. Так, число оборотов увеличивается в 200 раз: от 0,05 до 10 с^{-1} . Собственно гидролиз АТР чистым миозином идет очень быстро, но продукты реакции-ADP и P_i - высвобождаются медленно. Актин увеличивает число оборотов миозина, присоединяясь к комплексу миозин-ADP- P_i и ускоряя высвобождение ADP и P_i (рис. 34.12). После акта гидролиза актомиозин связывается с АТР, что

приводит к его диссоциации на актин и миозин. В результате вновь образуется комплекс миозин-АТР, входящий в новый каталитический цикл. Эти реакции идут с участием Mg^{2+} . Важнейшая особенность рассматриваемого цикла, который был предложен Эдвином Тейлором (Edwin Taylor) на основе изучения быстрой кинетики процесса, состоит в том, что актин обладает высоким сродством к миозину и комплексу миозин-ADP- P_i , но низким сродством к комплексу миозин-АТР. *Вследствие этого актин то присоединяется к миозину, то высвобождается из комплекса*

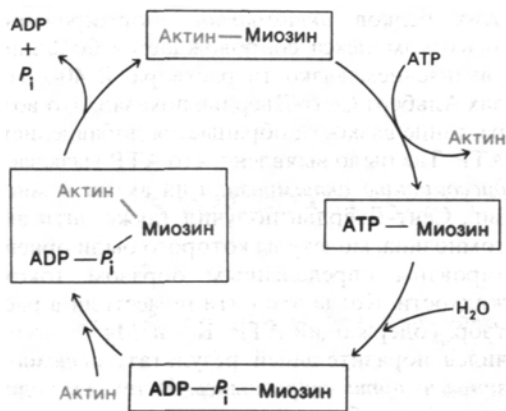


Рис. 34.12. Гидролиз АТФ приводит к циклическому образованию и распаду комплекса актина и миозина.

с ним - в зависимости от гидролиза АТФ. Как будет показано ниже, это АТФ-зависимое изменение во взаимодействии миозина и актина лежит в основе генерирования силы при мышечном сокращении.

34.7. Толстые и тонкие нити

мышечного волокна определенным образом ориентированы

Циклический процесс образования и диссоциации комплекса миозина и актина создает координированное движение потому, что эти белки входят в состав высокоорганизованной системы. Путем изучения интактных

миофиламентов, отделенных от мышцы, а также искусственных волокон, образованных из очищенного миозина, Хью Хаксли показал, как расположены молекулы миозина в толстых нитях. Выделенная из мышечного волокна *толстая нить* имеет диаметр 160 А и длину примерно 1,5 мкм (15 000 А). Вдоль нити периодически по спирали выступают *поперечные мостики*, и только в середине остается *свободная от мостиков область* протяженностью 1500 А (рис. 34.13).

Аналогичную структуру имеют и *искусственные толстые нити*, образующиеся при снижении ионной силы раствора миозина. Длина наиболее короткой искусственной нити составляет около 3000 А, а расположенная в середине свободная от мостиков зона - 1500 А. Поскольку такая же протяженность свободной зоны свойственна и более длинным искусственным нитям, очевидно, что рост толстых нитей происходит путем добавления молекул параллельно к уже собранному ряду. Молекулы миозина, расположенные по одну сторону от свободной от мостиков зоны, ориентированы в одном направлении, тогда как молекулы по другую сторону ориентированы в противоположном направлении. Следовательно, *толстые нити по самой своей природе биполярны*.

ЛММ, подобно миозину, агрегирует в растворах с низкой ионной силой, образуя нити с периодической структурой, где длина

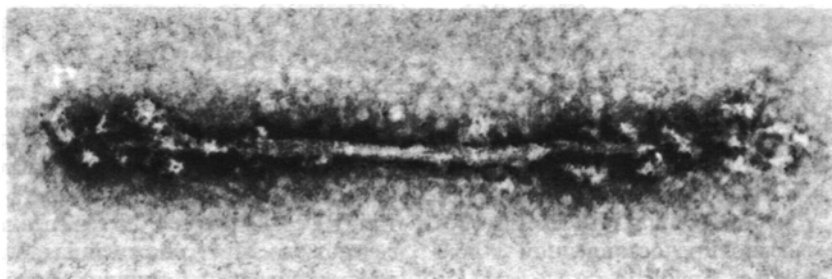


Рис. 34.13. Электронная микрофотография реконструированной толстой нити. По обе стороны от свободной зоны видны выступающие поперечные мостики. (Печатается с любезного разрешения д-ра Hugh Huxley.)

повторяющегося участка составляет по оси 430 А, т. е. столько же, сколько составляет расстояние между поперечными мостиками в интактной толстой нити. Однако нити из ЛММ гладкие, без выступающих мостиков. Это показывает, что *поперечные мостики образуются в ТММ-части миозина, тогда как ЛММ-единицы миозина образуют скелет толстых нитей*.

Тонкие нити также имеют определенное направление. Если миозин (или ТММ, или



Рис. 34.14. Электронная микрофотография нити F-актина, декорированной S1-головками ТММ. Все стрелки ориентированы в одну сторону. (Печатается с любезного разрешения д-ра James Spudich.)

S1) добавить к тонким нитям или F-актину, то формируется структура, которая под электронным микроскопом выглядит как ряд последовательно расположенных стрелок (рис. 34.14). Такие структуры получили образное название *декорированные нити*. По всей длине декорированных нитей стрелки на обоих тяжах направлены в одну сторону. Таким образом, *тонким нитям изначально*

присуща направленность, одинаковая на обоих тяжах, составляющих тонкую нить. В некоторых препаратах тонких нитей, полученных из гомогенизированных мышц, часть нитей сохраняет связь с Z-пластинкой. При декорировании таких препаратов тяжелым меромиозином стрелки на всех нитях оказались направлены в сторону от Z-пластинки. Отсюда следует, что *все тонкие нити по одну сторону от Z-пластинки ориентированы в одном направлении, тогда как нити, расположенные по другую сторону, - в противоположном.*

34.8. Полярность толстых и тонких нитей в середине саркомера меняется на противоположную

Полярность структуры толстых и тонких нитей играет решающую роль в координированном движении. Благодаря тому что участки взаимодействия на нитях актина и миозина ориентированы одинаково по отношению друг к другу, в ходе скольжения нитей происходит сложение сил, развивающихся в каждом участке взаимодействия. *Кроме того, посередине между двумя Z-пластинками направление нитей меняется на противоположное* (рис. 34.15). В итоге две тонкие нити при взаимодействии с одной толстой скользят навстречу друг другу, что приводит к уменьшению расстояния между Z-пластинками (рис. 34.16).

34.9. «Рабочим ходом» является поворот связанной с актином S1-головки миозина
Генерирование силы сокращения связано с циклическим образованием и диссоциацией комплекса между S1-головкой миозина и актином. Циклически повторяющиеся процессы присоединения, подтягивания

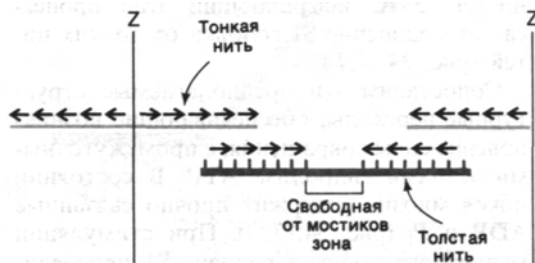


Рис. 34.15. Перемена полярности толстых и тонких нитей посередине между двумя Z-пластинками.

34. Мышечное сокращение и подвижность клеток

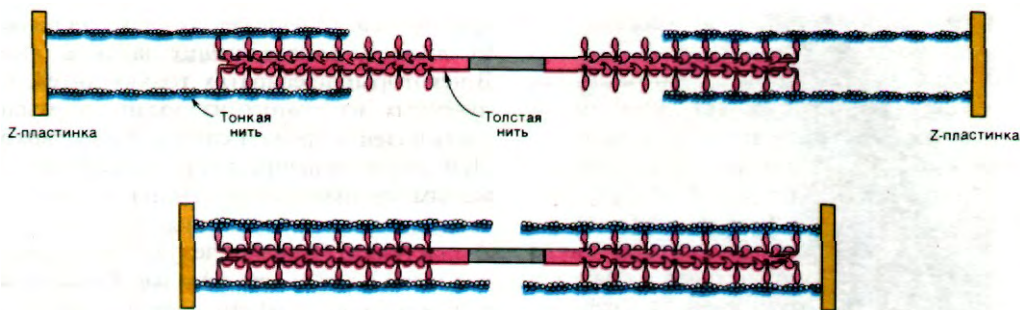


Рис. 34.16. Схема взаимодействия толстых и тонких нитей при сокращении скелетной мышцы. (По схеме, любезно предоставленной д-ром James Spudich.)

и отсоединения сопровождают даже одинокое сокращение. Механизм генерирования силы сокращения изучается в настоящее время методами биохимии, электронной микроскопии, дифракции рентгеновских лучей. Полученные данные показывают, что в покоей мышце головки S1 не связаны с тонкими нитями (рис. 34.17, А). В этом физиологическом состоянии головки S1 располагаются вокруг толстой нити по спирали. При стимуляции мышцы S1-головки отодвигаются от толстых нитей и прикрепляются к актиновым единицам на тонких нитях (рис. 34.17, Б). На следующем этапе головки S1 меняют свое направление так, что их длинная ось образует угол примерно 45° с осью тонких нитей (рис. 34.17, В). *Этот постулированный поворот головок миозина является, по-видимому, рабочим ходом мышечного сокращения.* Через S2-единицу миозина поворот S1-домена передается на толстую нить. В итоге толстая нить продвигается относительно тонкой примерно на 75 А. Завершающий этап процесса-отсоединение S1-головки от тонких нитей (рис. 34.17, Г).

Сопоставим эти предполагаемые структурные переходы, обеспечивающие возникновение силы сокращения, с промежуточными этапами гидролиза АТФ. В состоянии покоя миозин содержит прочно связанные АДФ и P_i (рис. 34.17, А). При стимуляции мышечного волокна головка S1 присоединяется к тонкой нити в перпендикулярном ей направлении (рис. 34.17, Б). Далее АДФ и P_i , связанные с S1, высвобождаются, а го-

ловка S1 совершает поворот, принимая наклонное положение по отношению к тонкой нити (рис. 34.17, В). Таким образом, «рабочий ход» обеспечивается высвобождением прочно связанных АДФ и P_i . На следующем этапе происходит отделение головки S1 от тонкой нити вследствие связывания АТФ (рис. 34.17, Г). Далее отсоединенная от актина головка S1 вновь становится около тонкой нити перпендикулярно ей. Завершающий этап цикла - гидролиз АТФ головкой S1, не связанной с актином.

В молекуле миозина имеется два типа шарнирных соединений, благодаря которым головка S1 обратимо присоединяется к актину или отсоединяется от него, а также, находясь в связанном с актином состоянии, меняет свое направление. Шарнир одного типа локализован между каждой из головок S1 и стержнем S2, а шарнир второго типа - между S2 и ЛММ-единицей миозина (рис. 34.18). Шарниры представляют собой гибкие участки полипептидной цепи, легко расщепляемые гидролитическими ферментами. Собственно сам факт ферментативного расщепления миозина на фрагменты ЛММ, S1 и S2 указывает на то, что *миозин образован из доменов, соединенных между собой шарнирными участками.* Функция домена S2 состоит в передаче напряжения от связанной с тонкой нитью головки S1 на домен ЛММ, составляющий часть толстой нити. Благодаря шарнирному участку между S1 и S2 головка S1 может по-разному взаимодействовать с актином в зависимости от того, имеются ли на ней прочно связанные АДФ и P_i или нет. Другой шарнирный участок, соединяющий S2 и ЛММ, допускает довольно большие изменения в положении S1 относительно толстой нити и тем самым обеспечивает точность взаимодействия S1 с актином. В итоге напряжение может генерироваться на большом протяжении латеральных поверхностей толстых и тонких нитей. В целом сег-

ментарная подвижность (гибкость) шарнирного типа играет критическую роль в мышечном сокращении, так же как и в механизме действия антител (разд. 33.7).

34.10. Тропонин и тропомиозин опосредуют регуляторное действие ионов кальция на мышечное сокращение

Физиологическим регулятором мышечного сокращения служит Ca^{2+} . Сетсуро Эбаша (Setsuro Ebashi) открыл, что влияние Ca^{2+} на взаимодействие актина и миозина опосредовано *тропомиозином* и *тропониновым комплексом*, которые локализованы в тонких нитях и составляют около трети их массы. Тропомиозин представляет собой двухцепочечный α -спирализованный тяж. Этот очень сильно вытянутый белок массой 70 кДа располагается почти параллельно длинной оси тонкой нити (рис. 34.19). Тропонин - комплекс трех полипептидных цепей: ТnC (18 кДа), ТnI (24 кДа) и ТnT (37 кДа). ТnC связывает ионы кальция, ТnI связывается с актином, а ТnT - с тропомиозином. Тропониновые комплексы расположены на тонких нитях на расстоянии 385 А друг от друга, причем этот интервал задается длиной тропомиозина. Тропониновый комплекс, связанный с одной молекулой тропомиозина, регулирует активность примерно 7 мономеров актина.

В отсутствие Ca^{2+} тропонин и тропомиозин ингибируют взаимодействие актина и миозина. При этом тропомиозин стерически блокирует участки связывания S1 на актине. Нервный импульс, как будет показано ниже, запускает высвобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикула. Высвобожденный Ca^{2+} связывается с ТnC-компонентом тропонина, что вызывает конформационные сдвиги, передающиеся на тропомиозин и затем на актин. В частности, тропомиозин передвигается к центру длинной впадины, идущей спирально вдоль тонкой нити. Это разрешает взаимодействие S1-головок миозина с актиновыми единицами тонких нитей. Возникает сила сокращения и одновременно гидролизуется АТФ; далее происходит удаление Ca^{2+} , и тропомиозин вновь блокирует доступ актина к S1-головкам миозина. Таким образом, *Ca^{2+} регулирует мышечное сокращение по аллостерическому механизму со следующей последовательностью передачи информации:*

$\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{Тропонин} \rightarrow \text{Тропомиозин} \rightarrow$
 $\rightarrow \text{Актин} \rightarrow \text{Миозин}.$

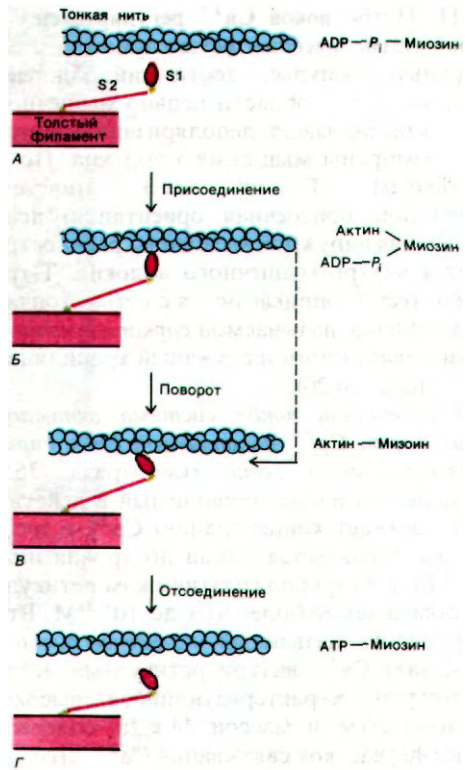


Рис. 34.17. Предполагаемый механизм генерирования силы при взаимодействии S1- головок нитей миозина с нитями актина. Поворот головки S1, связанной с актином, вызывает движение толстых нитей относительно тонких (на схеме - переход от Б к В).

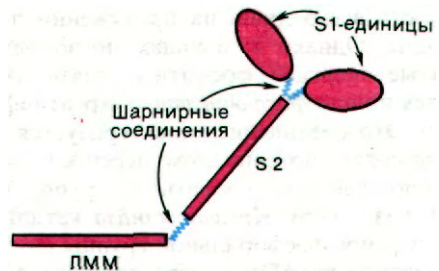


Рис. 34.18. Два типа шарнирных соединений в миозине - один между S1 и S2, второй между S2 и ЛММ - позволяют изменять положение головки S1 по отношению к актину во время «рабочего хода».

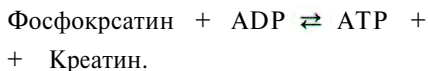
34.11. Поток ионов Ca^{2+} регулируется саркоплазматическим ретикуломом

Нервный импульс, достигший концевой пластинки, т.е. области нервно-мышечного контакта, вызывает деполяризацию наружной мембраны мышечного волокна. По Т-трубочкам (Т от англ. transverse orientation - поперечная ориентация) деполяризация наружной мембраны распространяется внутрь мышечного волокна. Т-трубочки тесно соприкасаются с сетью тончайших каналов, называемой *саркоплазматическим ретикуломом* и служащей хранилищем Ca^{2+} (рис. 34.20).

В состоянии покоя система активного транспорта Ca^{2+} накапливает его в саркоплазматическом ретикуле (разд. 36.9). Кальциевый насос, приводимый в действие АТФ, снижает концентрацию Ca^{2+} в цитоплазме покоящихся мышц до уровня ниже 10^{-6} М, а в саркоплазматическом ретикуле повышает ее более чем до 10^{-3} М. Вторым белок, названный *кальсеквестрином*, связывает Ca^{2+} внутри ретикулума. Кальсеквестрин, характеризующийся высокой кислотностью и массой 44 кДа, содержит более 40 участков связывания Ca^{2+} . Деполяризация мембран Т-трубочек вызывает выброс Ca^{2+} из цистерн саркоплазматического ретикулума. Высвобожденный Ca^{2+} связывается с ТnC-компонентом тропонинового комплекса и стимулирует мышечное сокращение, как это было описано выше.

34.12. Фосфокреатин - форма запасаания ~Р

То количество АТФ, которое имеется в мышце, может поддерживать сократительную активность всего лишь на протяжении доли секунды. Однако в мышцах позвоночных богатые энергией фосфатные связи запасаются в виде *фосфокреатина* (креатинфосфата). Это соединение характеризуется более высоким потенциалом переноса высокоэнергетических фосфатных групп, чем АТФ (разд. 11.6). *Креатинкиназа* катализирует перенос фосфорильной группы от фосфокреатина на ADP с образованием АТФ:



Некоторые беспозвоночные для накопления высокоэнергетических фосфорильных групп используют *фосфоаргинин*. Фосфо-

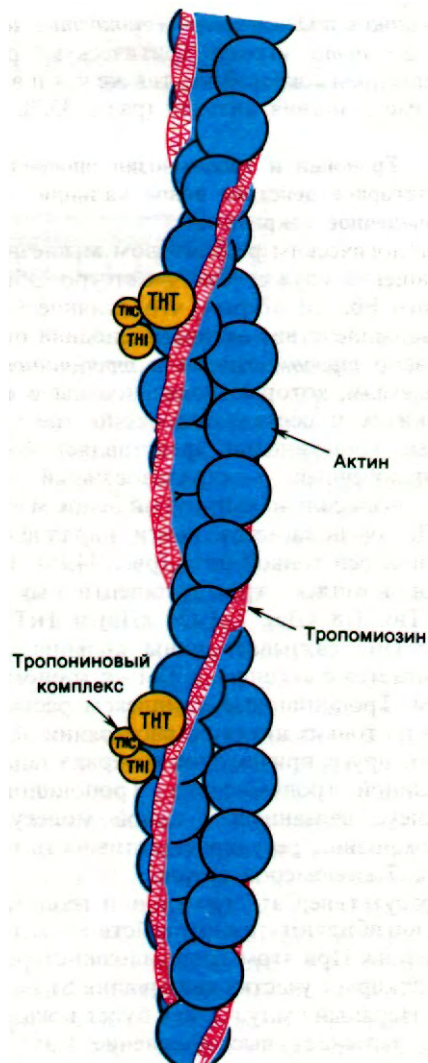


Рис. 34.19. Предполагаемая структура тонкой нити в состоянии покоя. Двойная спираль тропомиозина (показано красным цветом) блокирует участки актина (синий цвет), в которых при сокращении происходит связывание S1-головок миозина. При соединении Ca^{2+} к ТnC-компоненту тропонинового комплекса (показано желтым цветом) вызывает смещение спирали тропомиозина, при этом открываются участки связывания головок S1 на актине, и в итоге происходит сокращение. (Cohen C., Protein switch of muscle contraction, Scientific American, Inc., 1975.)

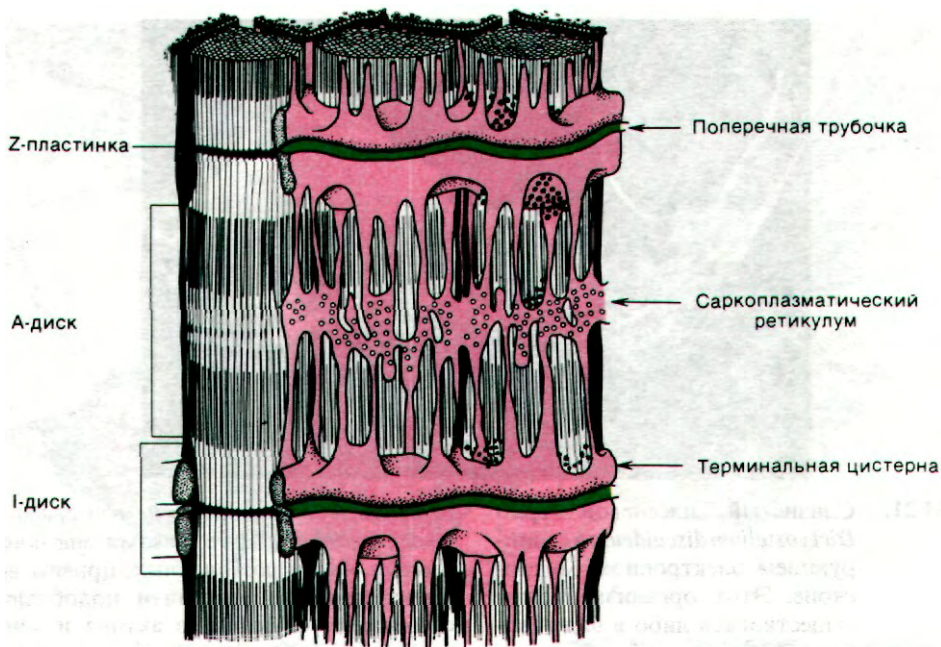


Рис. 34.20. Схематическое изображение саркоплазматического ретикула. [Peachey L. D., J. Cell Biol., 25, 222 (1965).]

креатин и фосфоаргинин называют *фосфагенами*.



В работающей мышце запас фосфокреатина быстро истощается, а следовательно, снижается и содержание АТФ. При этом возрастает концентрация АДФ и P_i , а также - под действием аденилаткиназы (миокиназы) - содержание АМР:



Понижение энергетического заряда приводит к стимуляции гликолиза, цикла трикарбоновых кислот и окислительного фосфорилирования (разд. 14.13) в работающей мышце. Относительный вклад каждого из

этих процессов в генерирование АТФ зависит от типа мышц. Так, в красных мышцах, цвет которых обусловлен высоким содержанием миоглобина и цитохромов дыхательной цепи, уровень аэробного обмена намного выше, чем в белых мышцах.

34.13. Актин и миозин служат сократительными элементами почти во всех эукариотических клетках

Давно уже установлено, что многие немышечные клетки способны передвигаться и менять свою форму. Миграция клеток в процессе развития эмбриона, передвижение макрофагов к поврежденным тканям, ретракция сгустка тромбоцитами, билиние микроворсинок кишечного эпителия - все это примеры, иллюстрирующие универсальность клеточной подвижности. Некоторые аспекты подвижности клеток можно исследовать на культурах ткани. Так, культивируемые клетки различных типов имеют плоские складчатые выросты, так называемые *ламеллиподии*, форма которых медленно меняется. Они напоминают легкие складки платья на ветерке, и потому их называют также *складчатыми краями* или *активными краями* (рис. 34.21). Складчатые края выступают наружу на несколько микрометров, и с их помощью клетка может прикрепляться

34. Мышечное сокращение и подвижность клеток

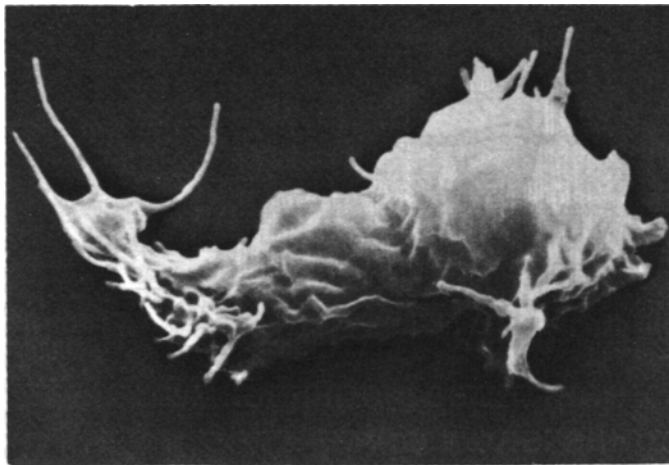


Рис. 34.21. Слизистый плесневой гриб *Dictyostelium discoideum* в сканирующем электронном микроскопе. Этот организм может существовать либо в виде свободных клеток, либо как часть организованной колонии. На поверхности *Dictyostelium* хорошо видны активные края и филоподии, богатые актином. (Печатается с любезного разрешения д-ра James Spudich.)

к поверхности. Если прикрепившаяся клетка вытягивает складки на одном конце и вытягивает на другом, то при этом она постепенно перемещается.

Каковы молекулярные основы движения клеток? Первые сведения по этому вопросу были получены Ариелем Лёви (Ariel Loewy) при изучении слизистого плесневого гриба *Physarum polycephalum*. Этот слизевик образует плазмодий и содержит перетекающие массы цитоплазмы. Полученные при высокой ионной силе экстракты гриба были сходны по свойствам с актомиозином поперечнополосатых мышц. Так, добавление АТР вызывало быстрое падение вязкости, которая затем вновь медленно возрастала по мере гидролиза АТР. Спустя несколько лет Садаси Гатано и Фумио Осава (Sadashi Natano, Fumio Osawa) обнаружили в грибе высокое содержание актина, очень сходного с мышечным. Он образовывал тонкие нити и взаимодействовал с миозином. Самое ин-

тересное, что *актин плесневого гриба* взаимодействовал с S1-головками *миозина скелетных мышц позвоночных*, причем возникали декорированные нити, подобные тем, которые образуются из актина и миозина позвоночных. Оказалось, что плесневой актин отличается от актина мышц кролика только по 17 из 375 аминокислотных остатков. Следовательно, *актин - это высококонсервативный, древний белок эукариот*. Аналогично актину из рассматриваемого плесневого гриба, а также из многих других эукариотических клеток был выделен и миозин. Однако *свойства миозинов из разных источников варьировали в большей степени, чем свойства актинов, выделенных из тех же источников*. Например, миозины из многих немышечных клеток не способны к быстрому формированию таких толстых нитей, какие образуются из миозина скелетных мышц. Немышечные миозины образуют короткие биполярные нити.

34.14. Распределение микрофиламентов в клетке выявляется методом иммунофлуоресцентной микроскопии

Как правило, клетки эукариот богаты актином, содержание которого составляет обычно 10% общего количества белка. По существу, актин - количественно преобладающий белок во многих типах клеток. Содержание миозина в немышечных клетках обычно в 10 раз ниже, чем актина. Следовательно, количественное отношение актина к миозину в немышечных клетках выше, чем в мышцах.

Часть актина в немышечных клетках полимеризуется с образованием *микрофиламентов* (рис. 34.22), напоминающих тонкие нити мышечного волокна. *Микрофила-*

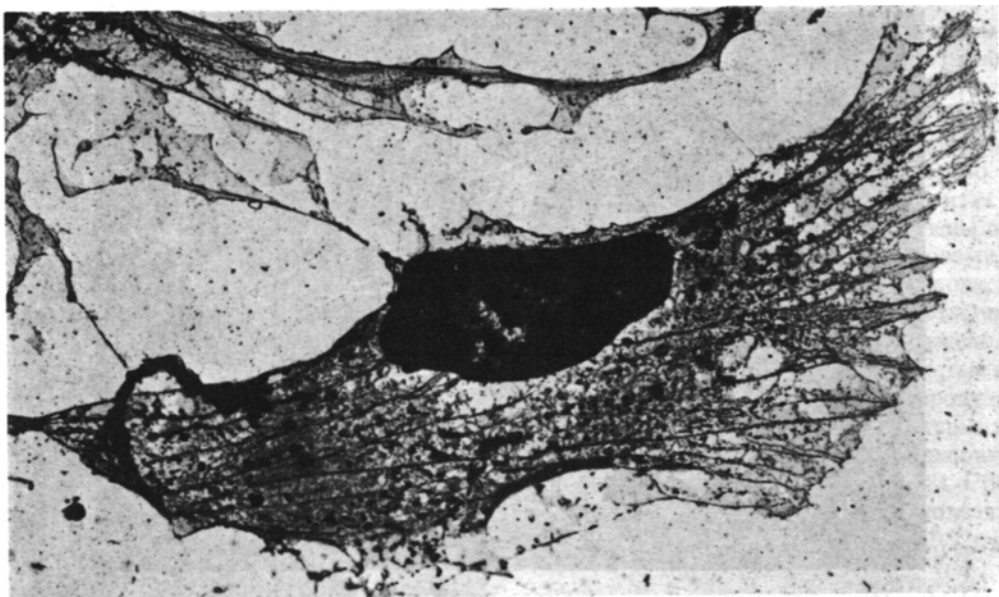


Рис. 34.22. Электронная микрофотография, демонстрирующая большое количество микрофиламентов в цитоскелете фибробластов эмбриона цыпленка. (Печатается с любезного разрешения д-ра Susan Brown.)

менты диаметром 70Å выявляются на электронных микрофотографиях почти всех клеток эукариот. Декорирование микрофиламентов головками S1 приводит к возникновению характерной структуры регулярно расположенных стрелок; из этого следует, что микрофиламенты состоят из актина и могут взаимодействовать с миозином (рис. 34.23).

Распределение микрофиламентов в клетке выявляется с помощью *иммуофлуоресцентной микроскопии*. Метод состоит в том, что получают специфические к актину антитела, ковалентно связывают их с флуоресцентной меткой, например с флуоресцентным, и добавляют к культивируемым клеткам. В результате проявляется сеть микрофиламентов, видимая под флуоресцентным микроскопом (рис. 34.24). Некоторые пучки флуоресцирующих нитей тянутся через всю клетку. В покоящейся клетке, прикрепленной к твердому субстрату, многие актиновые нити идут параллельно длинной оси клетки. В складчатых краях, напротив, флуоресценция имеет диффузный характер, что связано с наличием мономеров актина или

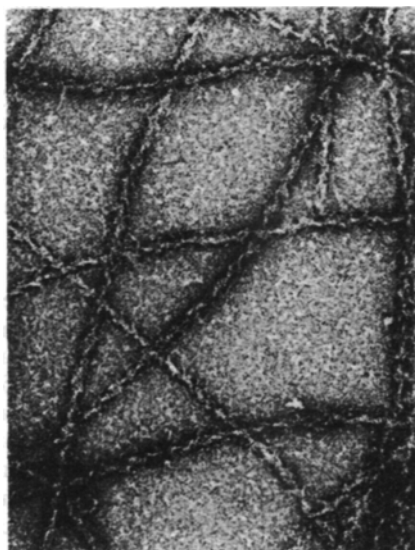


Рис. 34.23. Электронная микрофотография F-актина из *Dictyostelium*, декорированного S1-головками миозина также из *Dictyostelium*. Видно, что образуются такие же «наконечники стрел», как и в случае декорирования F-актина скелетных мышц S1-головками мышечного миозина. (Печатается с любезного разрешения д-ра James Spudich.)

34. Мышечное сокращение и подвижность клеток

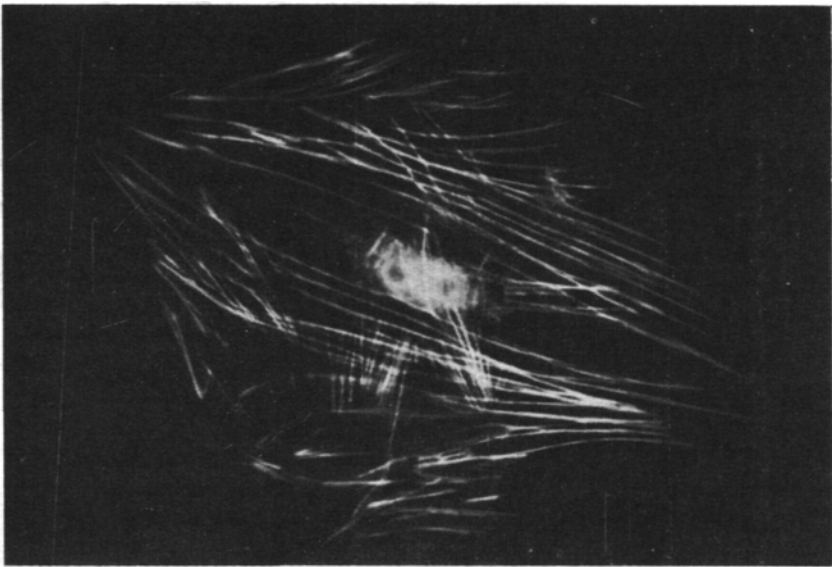


Рис. 34.24. Иммунофлуоресцентная микрофотография прикрепленной к поверхности покоящейся культивируемой клетки. Клетка окрашена флуоресцирующими антителами против актина. Видны длинные пучки микрофиламентов. (С любезного разрешения Elias Lazarides.)

34.15. Прикрепленные к мембране нити актина опосредуют сокращение микроворсинок кишечника

Микроворсинки эпителиальных клеток кишечника (рис. 34.27) - это одна из наиболее изученных немышечных сократительных систем. Микроворсинки представляют собой выпячивания цитоплазмы на апикальной

коротких нитей актина (рис. 34.25). Методом иммунофлуоресцентной микроскопии было также исследовано внутриклеточное распределение других сократительных белков. В микрофиламентах был обнаружен *тропомиозин* (рис. 34.26), тогда как тропонина в них, по-видимому, нет. Ионы кальция играют важную роль в регуляции не только мышечной, но и немышечной подвижности, хотя в целом эти два процесса регулируются по-разному. Относительно внутриклеточного распределения миозина известно очень мало. В немышечных клетках обнаружен также α -актинин, который в мышцах связывает актин с Z-пластинками миофибрилл. Этот белок присутствует в наибольшем количестве в складчатых краях и других участках клетки, где происходит быстрое формирование и распад нитей актина. Возможно, что α -актинин создает мостики между нитями актина в цитоскелете и другими образованиями, связанными с подвижностью.

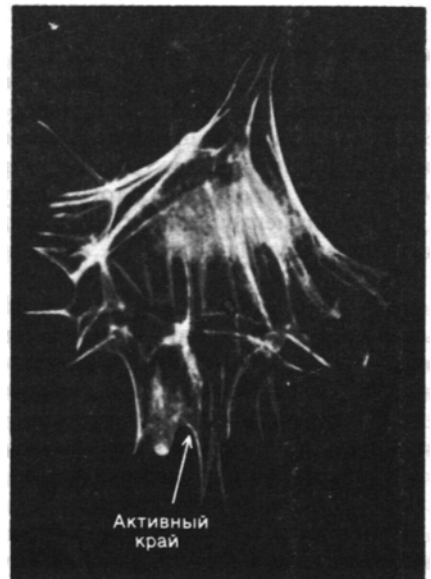


Рис. 34.25. Более диффузное распределение нитей актина вдвижущейся клетке, особенно в ее активных краях. (Печатается с любезного разрешения д-ра Elias Lazarides.)

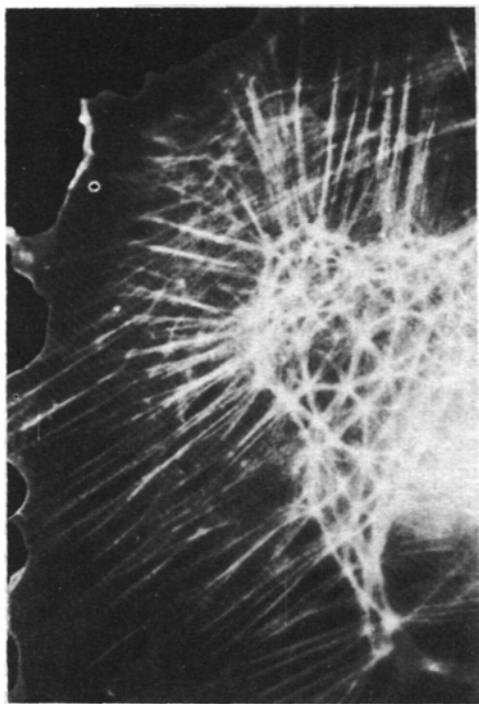


Рис. 34.26. В клетках, окрашенных флуоресцирующими антителами против актина, видны похожие на геодезические вышки куполообразные структуры. (Печатается с любезного разрешения д-ра Elias Lazarides.)

поверхности эпителиальных клеток кишечника, и в своей массе они образуют так называемую *щеточную каемку*, видимую в световом микроскопе. Каждая из микроворсинок содержит пучок актиновых нитей, которые на выступающем конце прикрепляются к плазматической мембране. Кроме того, во многих точках вдоль микроворсинки актиновые нити связаны с плазматической мембраной тонкими нитевидными соединениями. Остов актиновых филаментов проникает под поверхность клетки, достигая так называемой терминальной сети. Плазматическую мембрану изолированных щеточных каемок можно удалить, обработав их детергентом; остальная часть структуры при этом сохраняется интактной. Был обнаружен поразительный факт: лишенная мембраны щеточная каемка сокращается при добавлении АТФ и Ca^{2+} и актиновые нити быстро погружаются в терминальную сеть.

Какова структурная основа этой подвиж-

ности? Путем декорирования актиновых нитей микроворсинок S1-головками миозина было выявлено, что все нити имеют одинаковую полярность (рис. 34.28). Образовавшиеся стрелки оказались направленными к основанию микроворсинок (подобно тому как на декорированных тонких нитях мышечных волокон стрелки направлены в сторону Z-пластинок). Другими словами, полярность актиновых нитей такова, что микроворсинки при сокращении втягиваются в клетку. Было также обнаружено, что в терминальной сети имеются толстые нити, содержащие миозин. По всей вероятности, биполярные миозиновые нити терминальной сети взаимодействуют с нитями актина прилежащих ворсинок (рис. 34.28). Согласно этой гипотезе, нити актина скользят от-

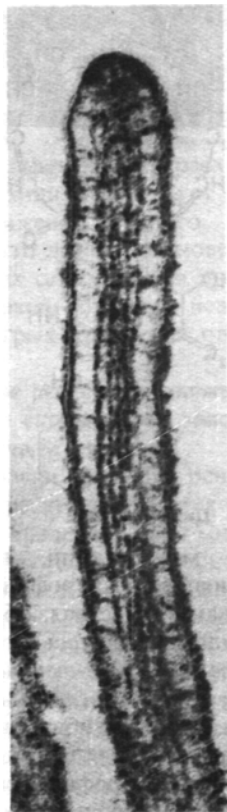
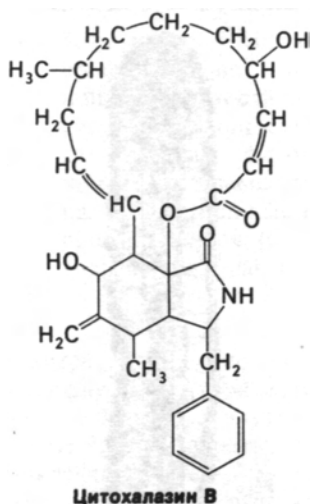


Рис. 34.27. Электронная микрофотография щеточной каемки кишечного эпителия. Микроворсинки содержат нити актина. [Mooseker M. S., Tilney L. G., J. Cell Biol., 67, 725 (1975).]

носителем нитей миозина, так что в целом движение направлено к центру клетки. В итоге микроворсинки укорачиваются, что способствует всасыванию питательных веществ клеткой.

34.16. Цитохалазин и фаллоидин тормозят подвижность, сопряженную с процессами сборки и дезагрегации нитей актина

Цитохалазин В (алкалоид из грибов) при добавлении к эукариотическим клеткам изменяет их форму и подавляет многие формы подвижности. Так, этот алкалоид ингибирует образование складчатых краев у фибробластов, отрастание аксонов от ганглиев, ретракцию кровяного сгустка тромбоцитами, деление оплодотворенной яйцеклетки морского ежа. Судя по данным



электронной микроскопии, цитохалазин оказывает влияние на микрофиламенты, так как они исчезают в клетках, обработанных этим алкалоидом. Оказалось, что *цитохалазин препятствует сборке актиновых нитей, специфически взаимодействуя с одним из концов нити*. Этот ингибиторный эффект цитохалазина свидетельствует о динамичности структуры микрофиламентов.

Значение постоянно идущих процессов сборки и дезагрегации микрофиламентов для клеточного движения было выявлено также при изучении механизма действия *фаллоидина*. Этот токсический агент присутствует в ядовитом грибе *Amanita phalloides*, содержащем также α -аманитин - ингибитор

РНК-полимеразы (разд. 29.18). Подобно цитохалазину, фаллоидин блокирует те формы подвижности, в которых участвуют микрофиламенты. *Фаллоидин присоединяется к единицам актина в микрофиламентах и тем самым препятствует его деполаризации*. Таким образом, фаллоидин как бы запирает микрофиламенты.

34.17. Микротрубочки участвуют в различных видах клеточной подвижности и частично формируют цитоскелет

До сих пор мы рассматривали роль микрофиламентов в различных видах клеточной подвижности. Обратимся теперь к другому классу волокнистых элементов, а именно к *микротрубочкам*, которые имеются практически во всех эукариотических клетках и участвуют как в поддержании архитектуры клетки, так и в сократительной активности (рис. 34.29). Микротрубочки представляют собой полые цилиндрические структуры, образованные из двух сходных (массой по 55 кДа) типов субъединиц - α - и β -*тубулина*. Наружный диаметр микротрубочек составляет около 240 А, и этим они четко отличаются от микрофиламентов (диаметром 70 А) и от промежуточных филаментов (структур диаметром 100 А, выполняющих роль связывающих элементов). Жесткая стенка микротрубочек образована из спирально уложенных, чередующихся

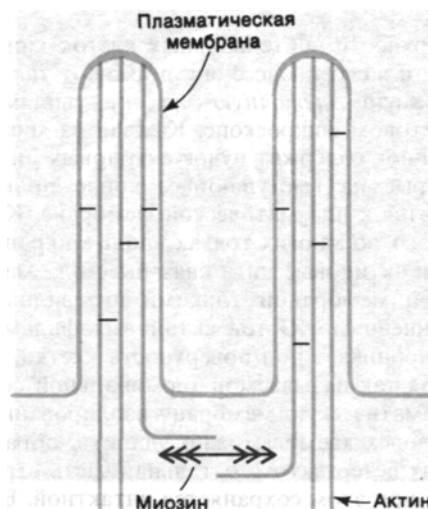


Рис. 34.28. Предполагаемое расположение миозина и актина в микроворсинках щеточной каемки кишки. [Mooseker M. S., Tilney L.G., J. Cell Biol., 67, 725 (1975).]

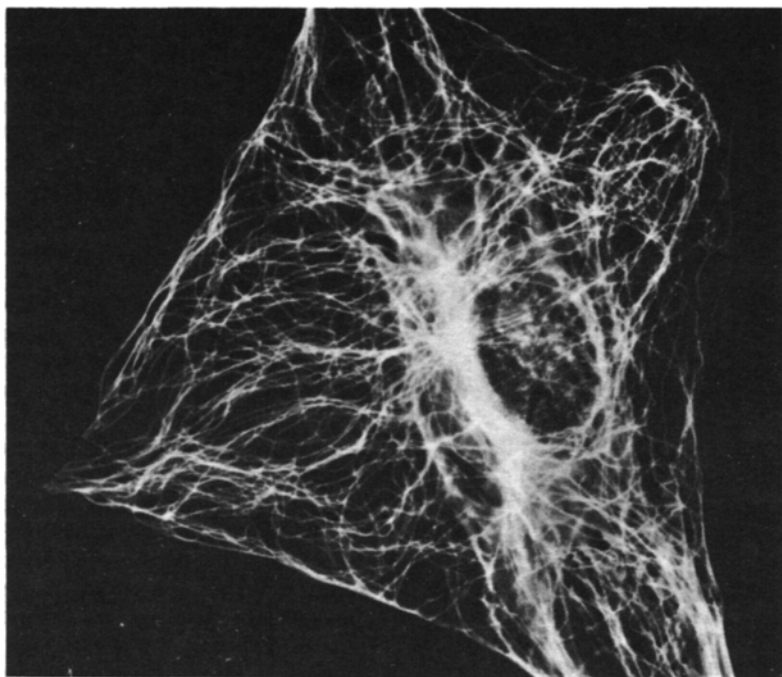


Рис. 34.29. Иммунофлуоресцентная микрофотография, демонстрирующая распределение микротрубочек в фибробласте. (Печатается с любезного разрешения д-ра Klaus Weber.)

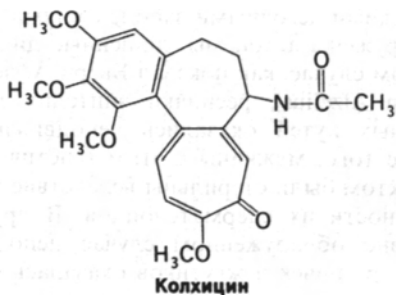
α - и β -тубулиновых субъединиц (рис. 34.30). Повторяющейся единицей структуры является $\alpha\beta$ -димер, и в целом структура образована из 13 протофиламентов, идущих параллельно длинной оси микротрубочки.

Сборка и дезагрегация микротрубочек происходят с противоположных концов. Алкалоид из осенних крокусов *колхицин* блокирует сборку и тем самым тормозит клеточные процессы, протекающие с участием микротрубочек. Например, колхицин останавливает клеточное деление на стадии метафазы, так как микротрубочки имеют су-

щественное значение для расхождения хромосом. Колхицин ингибирует также направленное движение разного рода частиц в клетках, что лежит в основе торможения процессов их секреции. На протяжении нескольких веков колхицин используют для лечения острых приступов подагры.

34.18. Биеение ресничек и движение жгутиков обусловлено скольжением микротрубочек, индуцированным динеином

Микротрубочки являются основными компонентами ресничек и жгутиков у эукариот. Эти органеллы имеются во многих клетках. Подвижные реснички, подобно веслам, вызывают ток жидкости параллельно поверхности клетки. Так, координированное движение ресничек, выстилающих дыхательные пути, способствует удалению чужеродных частиц. Жгутики необходимы для продвижения свободных клеток, таких, как спермии или простейшие. Как показали электронномикроскопические исследования, структура ресничек и жгутиков практически у всех эукариот в основе своей одинакова. Это пучок волокон, называемый *аксонемой*, который окружен мембраной, составляющей продолжение плазматической мембраны. Волокна в аксонеме - это микротрубочки. По перифе-



34. Мышечное сокращение и подвижность клеток

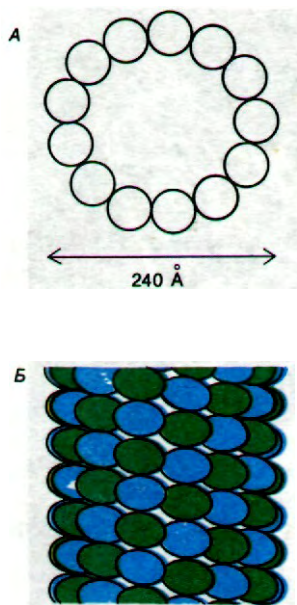


Рис. 34.30. Спиральное расположение тубулиновых субъединиц в микротрубочке. *А* - схематическое изображение поперечного среза; видно, что микротрубочка образована 13 протофиламентами. *Б* - поверхностная решетка из α - и β -субъединиц. [Snyder J. A., McIntosh J. R., Ann. Rev. Biochem., 45, 706 (1976).]

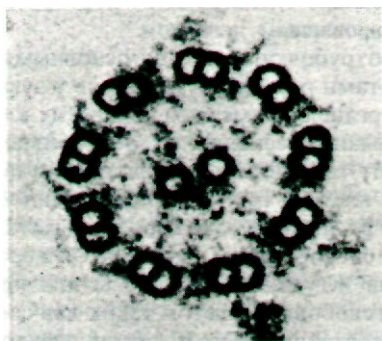


Рис. 34.31. Электронная микрофотография поперечного среза аксономы жгутика. Девять наружных двойных микротрубочек окружают две одинарные. (Печатается с любезного разрешения д-ра Joel Rosenbaum.)

рии расположены девять двойных микротрубочек, в центре - две одинарные микротрубочки (рис. 34.31). Такой часто встречающийся структурный мотив известен как *расположение 9 + 2*. Диаметр двух центральных микротрубочек равен 240 Å. Каждая из девяти периферических пар на поперечном срезе имеет вид цифры 8 и размер 370 x 250 Å (рис. 34.32). Одна из микротрубочек в паре - *субфибрилла А* - меньше по размеру и присоединяется к центральной капсуле реснички с помощью радиального мостика. От каждой субфибриллы *А* отходят две ручки. В отдельной ресничке все ручки направлены в одну сторону. Обработка ресничек детергентом и далее раствором солей высокой концентрации приводит к удалению наружной мембраны и солюбилизации АТРаза, называемой *динеином*. В результате этой обработки расположенные на периферии волокна сохраняют свою цилиндрическую попарную организацию, но утрачивают ручки. При добавлении динеина в соответствующей ионной среде ручки восстанавливаются. Следовательно, *состоящие из динеина ручки субфибриллы А обладают АТРазной активностью*.

Каким образом расщепление АТР динеином вызывает движение ресничек и жгутиков? Как показали Питер Сатир и Ян Гиббонс (Peter Satir, Jan Gibbons), *периферические двойные микротрубочки аксономы скользят относительно друг друга и тем самым вызывают изгиб реснички*. Само скольжение обусловлено образованием *динеиновых поперечных мостиков*. По-видимому, динеиновые ручки одной пары микротрубочек по мере гидролиза АТР продвигаются вдоль прилегающей пары совершенно аналогично тому, как в скелетной мышце миозиновые поперечные мостики движутся вдоль актиновой нити. В интактной ресничке радиальные мостики противодействуют скольжению, и благодаря им происходит не сокращение реснички, а локальный изгиб.

При обследовании группы больных хроническими легочными заболеваниями были обнаружены аксономы, лишенные динеина. В этом случае, как показал Бьёрн Афзелиус (Bjorn Afzelius), реснички эпителия дыхательных путей оказались неподвижными. Более того, мужчины с этим генетическим дефектом были стерильны вследствие неподвижности их сперматозоидов. В другом, недавно обнаруженном случае неподвижность ресничек и жгутиков оказалась обусловленной дефектом радиальных мостиков.

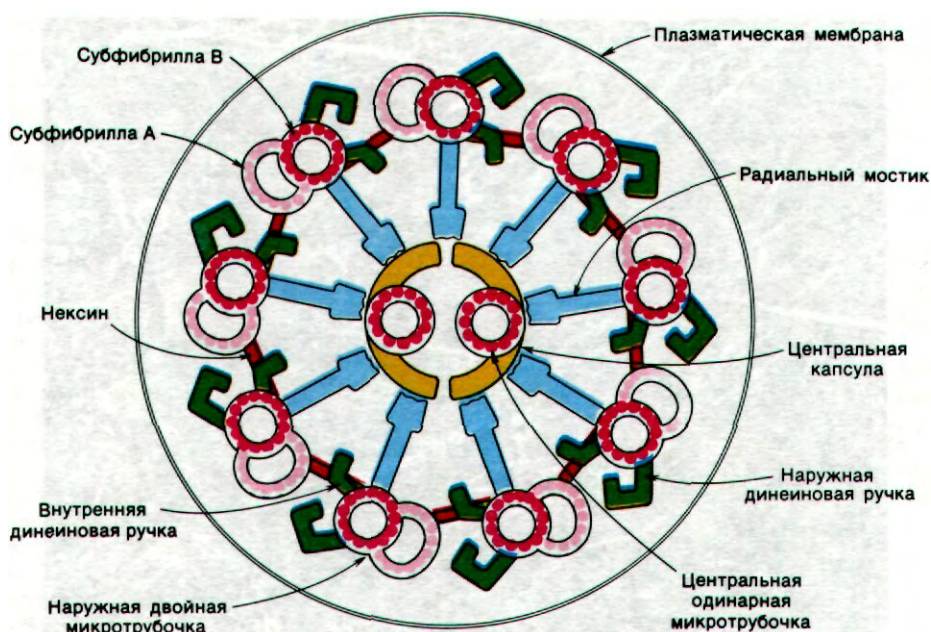


Рис. 34.32. Схематическое изображение структуры аксоны.

Эти клинические наблюдения подтверждают существующие представления о механизме движения рассматриваемых оргanelл.

Заключение

Поперечнополосатая мышца позвоночных состоит из белковых нитей двух типов, которые взаимодействуют друг с другом. Толстые нити содержат миозин, а тонкие — актин, тропомиозин и тропонин. Гидролиз АТФ актомиозином вызывает скольжение указанных нитей относительно друг друга. Миозин представляет собой очень большой по массе белок (500 кДа), состоящий из двух основных цепей и четырех легких цепей. Конформация основных цепей такова, что они содержат две глобулярные области (головки S1) и присоединенный к ним длинный α -спирализованный стержень. Головки S1 и часть стержня образуют поперечные мостики, которые взаимодействуют с актином, генерируя силу сокращения. Остальная часть молекулы миозина создает скелет толстой нити. Актин — основной компонент тонких нитей — представляет собой глобулярный белок (42 кДа), который полимеризуется с образованием нитей диаметром 70 Å. Толстые и тонкие нити определенным образом направлены, причем посе-

редине между двумя Z-пластинками это направление меняется на противоположное. Циклическое образование и диссоциация комплексов между миозиновыми поперечными мостиками, выступающими из толстых нитей, и единицами актина тонких нитей происходят за счет энергии АТФ;

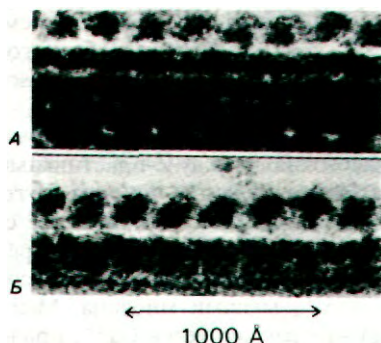


Рис. 34.33. Динеиновые ручки расположены вдоль микротрубочек с правильной периодичностью. Электронные микрофотографии интактной аксоны (А) и микротрубочки, реконструированной из тубулина и динеина (Б). [Haimo L. T., Telzer B. R., Rosenbaum J. L., Proc Nat. Acad. Sci., 76, 5760 (1979).]

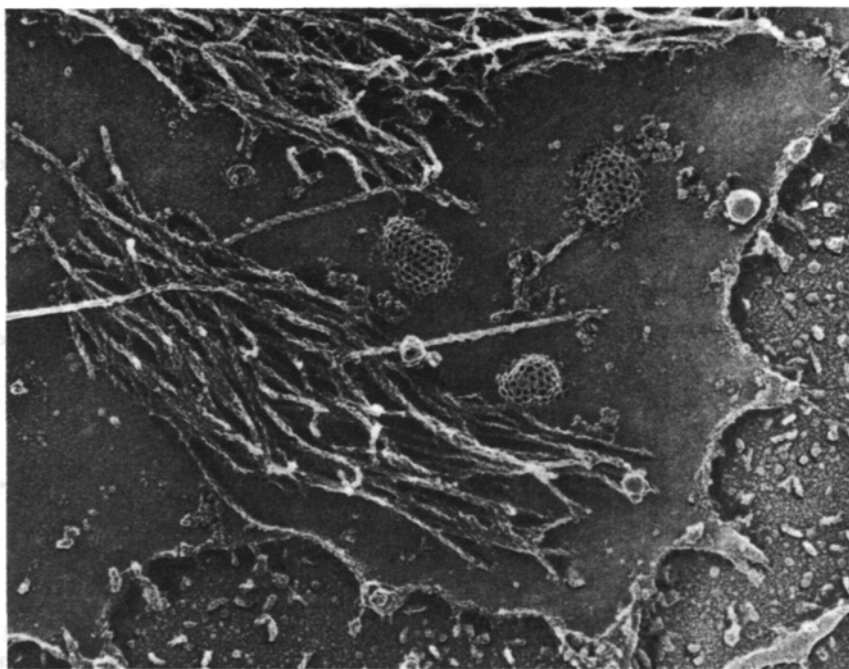


Рис. 34.34. Внутренняя поверхность плазматической мембраны фибробласта под электронным микроскопом. Ясно видны нити актина (декорированные S1-головками миозина) и окаймленные ямки на мембране. (Печатается с любезного разрешения д-ра John Heuser.)

образование комплексов ведет к уменьшению расстояния между Z-пластинками. «Рабочим ходом» является поворот S1-головки миозина, находящейся в комплексе с актином. В генерировании силы сокращения важную роль играют шарнирные соединения между доменами миозина. Мышечное сокращение регулируется Ca^{2+} , причем эффект Ca^{2+} опосредован тропонином и тропомиозином. При низкой концентрации Ca^{2+} эти белки ингибируют взаимодействие актина и миозина. Нервный импульс запускает высвобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума. Далее ионы кальция связываются с тропонином, что инициирует серию конформационных сдвигов, разрешающих в итоге взаимодействие актина и миозина.

Актин и миозин - эволюционно древние

белки, о чем свидетельствует тот факт, что они содержатся уже в слизистых грибах. В сущности, эти белки участвуют в сократительной активности практически всех эукариотических клеток. Особенно распространен актин, образующий микрофиламенты диаметром около 70 А. Микрофиламенты участвуют в разных видах клеточной подвижности, например в миграции клеток в ходе развития, ретракции кровяного сгустка тромбоцитами, передвижении макрофагов к поврежденным тканям. Сокращение ворсинок щеточной каемки кишечного эпителия опосредовано взаимодействием нитей актина с биполярными нитями миозина; последние в эпителиальных клетках кишечника меньше по размеру и содержатся в меньшем относительном количестве по сравнению с мышцами. Цитохалазин и фаллоидин тормозят те виды клеточной подвижности, которые связаны с агрегацией и диссоциацией нитей актина. Цитохалазин ингибирует сборку, а фаллоидин - распад микрофиламентов.

В клетках эукариот имеются микротрубочки, которые поддерживают архитектуру клетки, а также участвуют в сократительной активности. Микротрубочки представляют собой полые фибриллы диаметром 240 А; они построены из тубулина. Реснички и жгутики клеток эукариот содержат девять двойных микротрубочек, окружающих две

одинарные. Между внешними парами микротрубочек имеются поперечные мостики из динеина - белка, обладающего АТРазной активностью. Индуцированное динеином скольжение прилегающих пар микротрубочек относительно друг друга вызывает из-

гиб реснички или жгутика; этот механизм лежит в основе биения ресничек и движения жгутиков. Ингибитором подвижности, опосредованной микротрубочками, служит колхицин, который блокирует их полимеризацию.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Huxley H.E., 1965. The mechanism of muscular contraction, *Sci. Amer.*, 213(6), 18-27.

Cohen C., 1975. The protein switch of muscle contraction, *Sci. Amer.*, 233(5), 36-45.

Murray J.M., Weber A., 1974. The cooperative action of muscle proteins, *Sci. Amer.*, 230(2), 59-69.

Lazarides E., Revel J.P., 1979. The molecular basis of cell movement, *Sci. Amer.*, 240(5), 100-113.

Satir P., 1974. How cilia move, *Sci. Amer.*, 231(4), 44-52.

Dustin P., 1980. Microtubules, *Sci. Amer.*, 243(2), 66-76.

Книги

Cold Spring Harbor Laboratory, 1972. The Mechanism of Muscle Contraction, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, vol. 37. (Выдающийся сборник статей, посвященных структуре мышечных белков, механизму возникновения силы сокращения, системам регуляции, саркоплазматическому ретикулуму, миогенезу, а также сократительным белкам немускульных тканей.)

Goldman R., Pollard T., Rosenbaum J. (eds.), 1976. Cell Motility, Cold Spring Harbor Laboratory. (Содержит много прекрасных статей, посвященных микрофиламентам и микротрубочкам и их роли в клеточной подвижности.)

Inoue S., Stephens R.E. (eds.), 1975. Molecules and Cell Movement, Raven Press.

Hatano S., Ishikawa H., Sato H. (eds.), 1979. Cell Motility: Molecules and Organization, University Park Press.

Sugi H., Pollack G.H. (eds.), 1979. Cross-bridge Mechanism in Muscle Contraction, University Park Press.

Мышечное сокращение

Huxley H.E., 1971. The structural basis of muscle contraction, *Proc. Roy. Soc. London (B)*, 178, 131-149.

Haxley A.F., 1975. The origin of force in skeletal muscle, *Ciba Found. Symp.*, 31, 271-290.

Harrington W.F., 1979. Contractile proteins of muscle. In: Neurath H. and Hill R. L. (eds.), *The Proteins* (3rd ed.), vol. 4, pp. 245-409, Academic Press.

Adelstein R.S., Eisenberg E., 1980. Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction, *Ann. Rev. Biochem.*, 49, 921-956.

Hill T.L., 1977. Free Energy Transduction in Biology, Academic Press. (В гл. 5 дано ясное описание термодинамики мышечного сокращения.)

Huxley H.E., Farugi A.R., Bordas J., Koch M.H.J., Milch J.R., 1980. The use of synchrotron radiation in time-resolved x-ray diffraction studies of myosin layer-line reflections during muscle contraction, *Nature*, 284, 140-143.

Adelstein R.S. (ed.), 1980. Symposium on phosphorylation of muscle contractile proteins, *Fed. Proc.*, 39, 1544-1573.

McCubbin W.D., Kay C. M., 1980. Calcium-induced conformational changes in the troponin-tropomyosin complexes of skeletal and cardiac muscle and their roles in the regulation of contraction-relaxation, *Ace. Chem. Res.*, 13, 185-192.

Роль актина и миозина в клеточной подвижности

Korn E.D., 1978. Biochemistry of actomyosin-dependent cell motility (a review), *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 75, 588-599.

Clarke M., Spudich J.A., 1977. Non-muscle contractile proteins: the role of action and myosin in cell motility and shape determination, *Ann. Rev. Biochem.*, 46, 797-822.

Tilney L.G., 1979. Actin, motility, and membranes. In: Cone R.A. and Dowling J.E. (eds.), *Membrane Transduction Mechanisms*, pp. 163-186, Raven Press.

Lin S., Lin D.C., Flanagan M.D., 1978. Specificity of the effects of cytochalasin B on transport and motile processes, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 75, 329-333.

Brown S.S., Spudich J.A., 1979. Cytochalasin inhibits the rate of elongation of actin filament fragments, *J. Cell Biol.*, 83, 657-662.

Микротрубочки

Kirschner M.W., 1978. Microtubules: assembly and nucleation, *Int. Rev. Cytol.*, 54, 1-71.

Margolis R.L., Wilson L., 1978. Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steady state in vitro, *Cell*, 13, 1-8.

Amos L.A., Baker T.S., 1979. The three-dimensional structure of tubulin protofilaments, *Nature*, 279, 607-612.

Summers K.E., Gibbons I.R., 1971. ATP-induced sliding of tubules in trypsin-treated flagella of sea urchin sperm, *Proc. Nat. Sci.*, 68, 3092-3096. (Описаны остроумные опыты, показавшие, что волнообразное движение обычного жгутика возникает как результат индуцированного АТФ взаимодействия между прилегающими парными трубочками.)

Haimo L.T., Telzer B.R., Rosenbaum J.L., 1979. Dynein binds to and crossbridges cytoplasmic microtubules, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 76, 5759-5763.

Sturgess J.M., Chao J., Wong J., Aspin N., Turner J.A.P., 1979. Cilia with defective radial spokes: a cause of human respiratory disease, *New Engl. J. Med.*, 300, 53-56.

Промежуточные нити

Lazarides E., 1980. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space, *Nature*, 283, 249-256.

ГЛАВА 35

Действие гормонов

Гормоны - это химические посредники, координирующие активность различных клеток многоклеточного организма. Термин «гормон» был впервые использован в 1904 г. Уильямом Бэйлиссом и Эрнстом Старлингом (William Bayliss, Ernest Starling) при описании действия секретина - вещества, секретируемого двенадцатиперстной кишкой и стимулирующего выделение сока поджелудочной железы. Из этой работы вытекала очень плодотворная концепция, а именно, что 1) гормоны - это молекулы, синтезируемые специфическими тканями (*железами*); 2) гормоны секретируются непосредственно в кровь, которая и доставляет их к месту действия; 3) гормоны специфическим образом меняют активность определенных чувствительных тканей (*органов-мишеней* или *клеток-мишеней*). По своей химической природе гормоны очень разнообразны. Некоторые, например адреналин и тироксин, представляют собой *небольшие молекулы, производные аминокислот*. Другие, в частности окситоцин, инсулин и тиреотропин (тиреотропный гормон), - *полипептиды* или *белки*. Третья группа гормонов - *стероиды, производные холестерина*. В настоящее время выяснен молекулярный механизм действия ряда гормонов. Установлено, что *гормоны оказывают специфическое действие тремя путями*: 1) *воздействуя на скорость синтеза ферментов и других белков*; 2) *изменяя скорость ферментативного катализа*; 3) *изменяя проницаемость клеточных мембран*. Любопытно отметить, что ни один гормон не является ферментом или коферментом. Напротив, действие гормонов сводится к *регуляции уже существующих процессов*.

35.1. Открытие циклического АМР - посредника в действии многих гормонов
Важнейшее достижение в изучении механизма действия гормонов связано с именем Эрла Сазерленда (Earl Sutherland). Первоначальная цель его работ, начатых в 50-х годах, состояла в том, чтобы выяснить механизм действия адреналина и глюкагона на распад гликогена и образование глюкозы в печени. Сазерленд избрал эту систему, во-первых, потому, что указанные гормоны оказывают очень значительное и воспроизводимое действие на распад гликогена. Во-вторых, этот эффект развивается в течение нескольких минут. В-третьих, срезы печени нетрудно получить в большом количестве. В-четвертых, биохимия распада гликогена уже была достаточно хорошо изучена (гл. 16). Фактически Сазерленд начал свои исследования механизма действия адреналина и глюкагона в лаборатории Карла и Герти Кори (Carl Cori, Gerty Cori).

На начальном этапе работы он стремился выявить ту ферментативную реакцию в процессе превращения гликогена в глюкозу, которую усиливали эти гормоны. Для этого срезы печени инкубировали в присутствии $^{32}P_i$ и определяли, в какие промежуточные соединения включалась метка. Оказалось, что ферментом, лимитирующим скорость процесса расщепления гликогена, была фосфорилаза, а не фосфоглюкомутаза или глюкозо-6-фосфатаза. Более того, адреналин и глюкагон увеличивали активность фосфорилазы. Однако механизм активации был неясен. Далее Сазерленд обнаружил фермент, катализировавший инактивацию активной фосфорилазы. Этот инактивирующий фермент оказался фосфатазой; напрашивалось предположение, что активация фосфорилазы обусловлена ее фосфорилированием. Действительно, при инкубации срезов печени с $^{32}P_i$ обнаружилось, что скорость включения



Рис. 35.1. Электронная микрофотография соматотропной клетки гипофиза. Гормон роста (соматотропин) накапливается в электронноплотных гранулах, четко видных на микрофотографии. (С любезного разрешения Lynne Mercer.)

метки в фосфоорилазу возрастала в присутствии адреналина и глюкагона, причем это возрастание было прямо пропорционально действию гормонов на распад гликогена. Таким образом, в результате этих исследо-

ваний и было установлено, что *фосфоорилаза активируется при фосфоорилировании и инактивируется при дефосфоорилировании. Это был первый пример регуляции активности фермента с помощью механизма ковалентной модификации.*

Далее приступили к анализу активации фосфоорилазы гормонами в препарате разрушенных клеток печени. Поразительным образом добавление адреналина и глюкагона приводило, как и в опытах со срезами

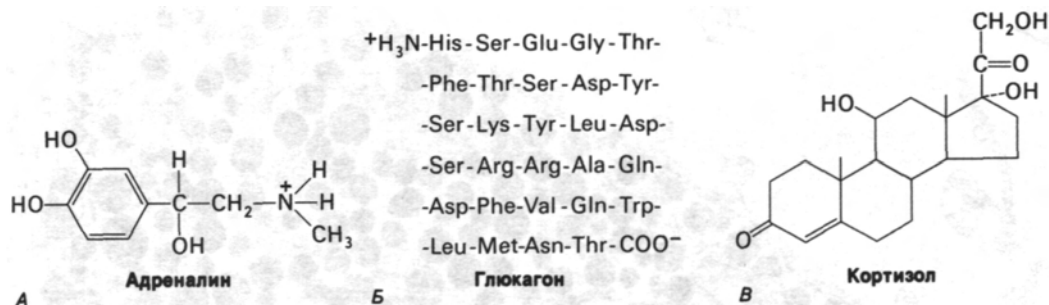
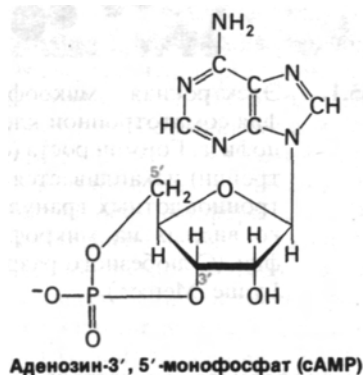


Рис. 35.2. Примеры трех химически различных классов гормонов: *А* - адреналин, производное аминокислоты; *Б* - глюкагон, полипептид; *В* - кортизол, стероид.

печени, к активации фосфорилазы. *Обнаружение того факта, что гормональный эффект проявляется и в бесклеточном гомогенате, явилось новой вехой в развитии биохимии.* Дело в том, что ранее не удавалось наблюдать специфического действия гормонов в бесклеточных системах, и многие биологи полагали, что гормоны способны воздействовать только на интактную клетку-мишень. Любопытно вспомнить, как за полвека до этого Бухнер (Buchner) опровергли совершенно аналогичные воззрения, доказав, что процесс брожения может идти и в бесклеточном экстракте дрожжей. Однако в отличие от гликолитических ферментов не все компоненты системы, обеспечивающей ответ на адреналин и глюкагон, оказались растворимыми. Так, после центрифугирования гомогената клеток печени ответная реакция на добавление гормонов исчезала. Следовательно, какая-то существенная часть системы гормонального ответа была локализована во фракции мембран. Действительно, гормональный ответ можно было восстановить, добавив к надосадочной жидкости фракцию субклеточных частиц.

Роль субклеточных частиц была выявлена следующим образом. При инкубации этой фракции с адреналином и глюкагоном образовывался некий термостабильный фактор. Добавление этого фактора к надосадочной фракции приводило к ак-

тивации фосфорилазы. Другими словами, *гормональный ответ удалось разделить на два этапа: взаимодействие гормона с мембранной фракцией, приводящее к образованию термостабильного фактора, и действие этого фактора на надосадочную фракцию, выражающееся в активации фосфорилазы.* Следующая задача состояла в том, чтобы идентифицировать термостабильный фактор, полученный в очень малом количестве. По данным химического анализа это был аденинрибонуклеотид, но с необычными свойствами. Сазерленд описал его в письме Леону Хеппелю (Leon Heppel), к которому обратился в надежде на помощь в изучении структуры этого вещества. В это же время Хеппель получил письмо от Дэвида Липкина (David Lipkin) с описанием нового нуклеотида, полученного путем обработки АТР гидрооксидом бария. Хеппель пришел к выводу, что Липкин и Сазерленд изучают одно и то же вещество, и помог им связаться друг с другом. Действительно, оба ученых исследовали одно и то же соединение, оказавшееся аденозин-3',5'-монофосфатом, или, как его обычно называют теперь, *циклическим*



АМР (сАМР). Эта случайная встреча двух ученых принесла еще одну пользу: сразу возникла возможность получения больших количеств сАМР для биохимических иссле-

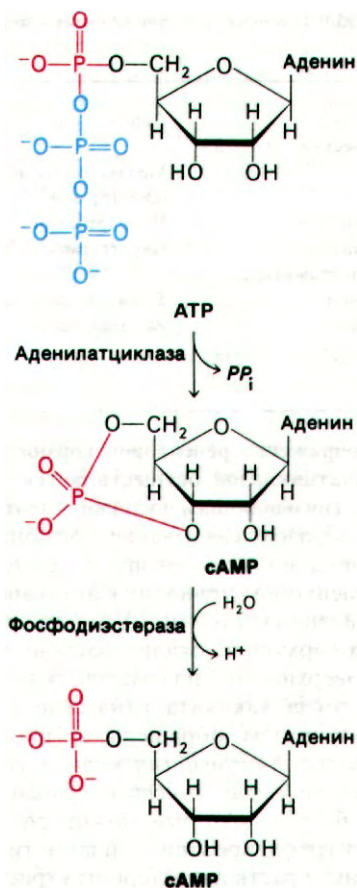


Рис. 35.3. Ферментативный синтез и распад сАМР.

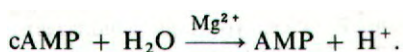
дований. Более того, в результате лабораторного синтеза сАМР из АТР и гидроксида, бария появилась возможность выдвинуть предположение о вероятном пути биосинтеза этого соединения.

35.2. Циклический АМР синтезируется аденилатциклазой и расщепляется фосфодиэстеразой

сАМР образуется из АТР под действием мембранного фермента *аденилатциклазы*:



Эта реакция в небольшой степени эндергонична; ее ΔG° составляет около 1,6 ккал/моль. Источником энергии для синтеза сАМР служит последующий гидролиз пирогосфата. Специфическая *фосфодиэстераза* разрушает сАМР путем гидролиза до АМР:



Это высокоэкзергоническая реакция с ΔG° около -12 ккал/моль. В отсутствие фосфодиэстеразы сАМР - очень стабильное соединение.

35.3. сАМР служит вторым посредником при действии многих гормонов

Работа Сазерленда привела к созданию концепции о роли сАМР как *второго посредника* в механизме действия некоторых гормонов. Первым посредником является сам гормон. Сущность этой концепции заключается в следующем.

1. Плазматические мембраны клеток содержат рецепторы гормонов.

2. Взаимодействие гормона с его специфическим рецептором на плазматической мембране ведет к стимуляции аденилатциклазы, также связанной с плазматической мембраной.

3. В результате активации аденилатциклазы в клетке увеличивается содержание сАМР.

4. Действие сАМР проявляется внутри клетки и состоит в изменении скорости одного или более процессов.

Важная особенность этой гипотезы второго посредника состоит в том, что она не предполагает проникновения гормона в клетку. Действие самого гормона ограничивается клеточной мембраной. Биологический эффект гормона опосредован действием сАМР внутри клетки; непосредственного действия сам гормон не оказывает. Обоснованность этой концепции была проверена с использованием целого ряда экспериментальных критериев, а именно:

1. Аденилатциклазу клетки должны стимулировать те гормоны, которые действуют на эту клетку как на мишень. Гормоны, не вызывающие специфического биологического ответа данной клетки, не должны повышать в ней активности этого фермента.

2. Концентрация сАМР в клетках-мишенях должна изменяться пропорционально биологическому ответу этих клеток на гормональную стимуляцию, т.е. она должна проявлять временную и количественную зависимость от концентрации гормона.

3. Ингибиторы фосфодиэстеразы, например теофиллин или кофеин, должны действовать синергично с теми гормонами, эф-



фekt которых опосредован сАМР как вторым посредником.

4. Добавление сАМР или родственного ему соединения к клеткам-мишеням должно имитировать биологическое действие гормона. (На практике сАМР в таких опытах не используется, так как он плохо проникает в клетки; однако менее полярные производные сАМР, в частности дибутирил-сАМР, проникают в клетки и оказывают свое действие.)

Проведенные опыты показали, что *циклический АМР является вторым посредником при действии не только адреналина и глюкагона, но и многих других гормонов* (табл. 35.1). сАМР оказывает влияние на исключительно большое число клеточных процессов. Так, под действием этого соединения увеличивается распад накопленных запасов топливных веществ, повышается выделение соляной кислоты слизистой желудка, происходит дисперсия пигментных гранул меланина, уменьшается агрегация тромбоцитов.



Рис. 35.4. Разделение аденилатциклазы и β-адренергического рецептора центрифугированием солюбилизированной (в растворе детергента) плазматической мембраны в градиенте плотности сахарозы. [Haga T., Haga K., Gilman A.G., J. Biol. Chem., 252, 5776 (1977).]

Таблица 35.1. Гормоны, действие которых опосредовано сАМР

Кальцитонин	Липотропин
Хорионический гонадотропин	Меланоцитстимулирующий гормон
Кортикотропин	Норадреналин
Адреналин	Паратгормон
Фолликулостимулирующий гормон	Тиреотропный гормон
Глюкагон	Вазопрессин
Лютеинизирующий гормон	

35.4. Сопряжение рецепторов гормонов с аденилатциклазой осуществляется белком, связывающим гуаниннуклеотиды

Каким образом связывание гормона типа адреналина или глюкагона со специфическим рецептором приводит к активации молекулы аденилатциклазы? Участки связывания этих гормонов локализованы на наружной поверхности плазматической мембраны, тогда как каталитические участки аденилатциклазы обращены к цитозолю. В сущности, *участки связывания гормона и каталитические участки принадлежат разным белкам*, которые можно разделить при центрифугировании плазматической мембраны в растворе детергента (рис. 35.4). Аденилатциклаза (185 кДа) и рецептор адреналина (75 кДа) представляют собой большие интегральные белки мембраны. Рецептор адреналина называют также *β-адренергическим рецептором*, поскольку он связывает целый ряд фармакологически активных соединений.

Связывание гормона со специфическим рецептором оказывает активирующее действие на аденилатциклазу не прямо, а опосредованно — через третий белок, называемый *G-белком*¹ (от англ. *guanyl*, поскольку этот белок связывает гуаниннуклеотиды). Этот регуляторный белок (42 кДа) существует в двух формах. Комплекс G-белка с GTP активирует аденилатциклазу, тогда как комплекс G-белка с GDP такого действия не оказывает. G-белок превращается из неактивной GDP-формы в активную GTP-форму в результате обмена связанного GDP на GTP. Этот GTP—GDP-обмен катализируется гормон-рецепторным комплексом, но не свободным рецептором. Та-

¹ В отечественной литературе чаще используется обозначение N-белок. — *Прим. перев.*

ким образом, путь передачи информации идет от рецептора гормона на G-белок и далее на аденилатциклазу (рис. 35.5).

Как происходит выключение аденилатциклазы? G-белок обладает еще одним свойством, благодаря которому он может передавать информацию от рецепторов гормона на аденилатциклазу. Дело в том, что связанный с G-белком GTP медленно гидролизуется до ADP. Другими словами, G-белок является GTPазой. Следовательно, этот регуляторный белок содержит встроенное в него устройство для инактивации аденилатциклазы. Доля G-белка, находящегося в комплексе с GTP, а соответственно и степень активации аденилатциклазы зависят от отношения скорости обмена GDP на GTP к скорости гидролиза GTP. Скорость GTP-GDP-обмена значительно возрастает при связывании G-белка с комплексом гормон—рецептор. Следовательно, при низком содержании гормона почти весь G-белок находится в GDP-форме и соответственно почти вся аденилатциклаза неактивна. В некоторых клетках активация аденилатциклазы зависит также от концентрации Ca^{2+} . Для активации аденилатциклазы в этих клетках необходим не только G-белок в GTP-форме, но и комплекс Ca^{2+} с кальмодулином (белок массой 17 кДа). Таким образом, в настоящее время начал проявляться вопрос о том, какие регуляторные циклы определяют активность аденилатциклазы.

35.5. Циклический АМР активирует протеинкиназы

Каким образом сАМР воздействует на столь большое число различных клеточных процессов? Есть ли в этих воздействиях что-либо общее? Действительно, такая общность имеется, и обнаружена она была опять-таки при изучении регуляции обмена гликогена - участка метаболизма, где «родился» сАМР. Эдвин Кребс и Донал Уолш (Edwin Krebs, Donal Walsh) установили, что сАМР активирует протеинкиназу в скелетных мышцах. Протеинкиназа фосфорилирует как гликоген-синтазу (переводя ее в неактивное состояние), так и киназу фосфоорилазы (переводя ее в активное состояние). Таким путем сАМР стимулирует распад гликогена и ингибирует его синтез в мышцах (разд. 16.15). Аналогичный механизм действует в печени. По существу, все известные эффекты сАМР обусловлены активацией протеинкиназ. Все исследованные

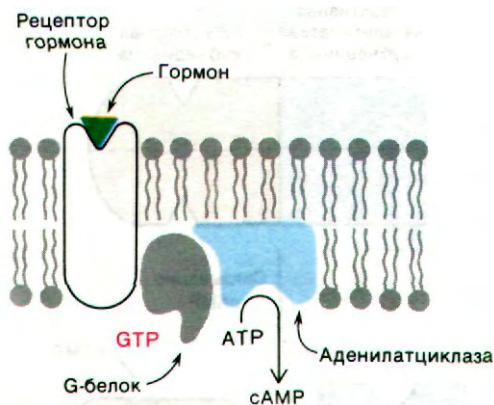


Рис. 35.5. Путь передачи информации при активации аденилатциклазы, вызванной связыванием гормона со специфическим рецептором. G-белок играет решающую роль как в активации, так и в инактивации аденилатциклазы.

до сих пор клетки содержат протеинкиназы, которые активируются под действием сАМР в концентрации порядка 10^{-8} М. Эти киназы модулируют активность различных белков путем их фосфорилирования.

Интересен механизм активации протеинкиназы мышц циклическим АМР. Этот фермент состоит из субъединиц двух типов: регуляторной (R) субъединицы (49 кДа), связывающей сАМР, и каталитической (C) субъединицы (38 кДа). В отсутствие сАМР регуляторная и каталитическая субъединицы образуют комплекс R_2C_2 , лишенный ферментативной активности. Присоединение сАМР к каждой из регуляторных субъединиц приводит к диссоциации комплекса R_2C_2 на одну R_2 -субъединицу и две C-субъединицы. Свободные каталитические субъединицы обладают ферментативной активностью. Следовательно, присоединение сАМР к регуляторной субъединице снимает ингибирование каталитической субъединицы. сАМР при этом функционирует как аллостерический эффектор. Своей субъединичной структурой (наличием отдельных регуляторных и каталитических субъединиц) протеинкиназа напоминает аспартат-транс-карбамоилазу (разд. 22.14).

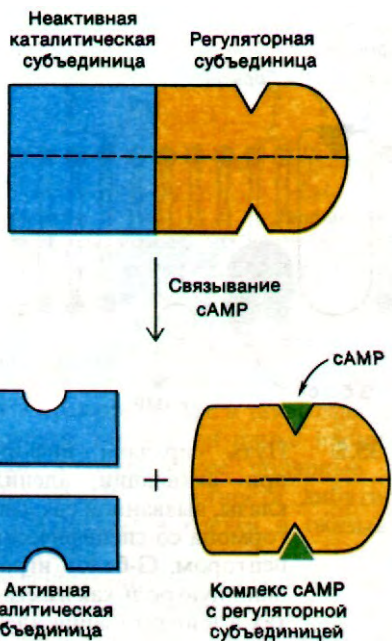


Рис. 35.6. cAMP активирует протеинкиназу, вызывая диссоциацию комплекса регуляторных и каталитических субъединиц фермента.

35.6. Циклический AMP - эволюционно древний сигнал голодания

Как было описано выше (разд. 28.6), cAMP оказывает регуляторное действие на клетки бактерий, у которых он стимулирует транскрипцию определенных генов. Очевидно, что *cAMP как вещество-регулятор имеет длинную эволюционную историю*. У бактерий cAMP служит сигналом голодания. Появление cAMP свидетельствует об отсутствии глюкозы и ведет к синтезу ферментов, необходимых для использования других источников энергии. В некоторых клетках млекопитающих, таких, как клетки печени и мышц, cAMP сохраняет свою древнюю функцию сигнала голодания, но при этом действие cAMP направлено на стимуляцию протеинкиназы, а не на усиление транскрипции определенных генов. Еще одно важное различие состоит в том, что у высших организмов cAMP стал вторым посредником, участвуя во внутриклеточных, а не внеклеточных коммуникативных связях.

Почему в ходе эволюции cAMP превра-

тился во второго посредника? Представляется, что здесь сыграли роль три фактора.

1. cAMP образуется из повсеместно присутствующего АТФ в ходе несложной реакции, протекающей за счет энергии последующего гидролиза пироглюкаты.

2. Будучи производным вещества, занимающего центральное положение в метаболических превращениях, сам cAMP стоит в стороне от основных путей метаболизма. cAMP используется только как интегратор обмена веществ и не является ни предшественником в процессах биосинтеза, ни промежуточным продуктом в энергетическом обмене. Вследствие этого концентрация cAMP может регулироваться однозначно. Более того, cAMP стабилен, если не подвергается действию специфической фосфодиэстеразы.

3. cAMP обладает достаточным количеством функциональных групп, которые обеспечивают прочное и специфическое связывание с рецепторными белками (например, с регуляторной субъединицей протеинкиназы мышц) и развитие соответствующих аллостерических эффектов.

Важно отметить, что *использование cAMP как второго посредника приводит к значительному усилению гормонального сигнала*. Так, многие гормоны в крови присутствуют в концентрациях порядка 10^{-10} М. В стимулированных клетках-мишенях концентрация cAMP намного выше, так как каждая активированная молекула аденилатциклазы синтезирует много молекул cAMP. Фосфорилирование множества молекул белка молекулой протеинкиназы, активированной cAMP, представляет собой еще один этап усиления гормонального сигнала. Каскад

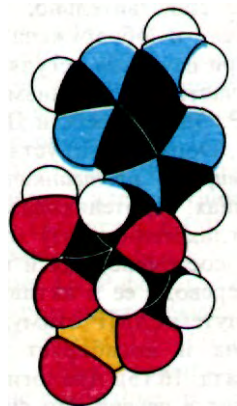


Рис. 35.7. Пространственная модель cAMP.

ферментативных реакций, регулирующих обмен гликогена, служит примером того, как малые стимулы могут вызвать значительные изменения метаболизма клетки.

35.7. Холерный токсин стимулирует аденилаткиназу, ингибируя GTP-азную активность G-белка

Непосредственное участие cAMP в патологических процессах было четко установлено при холере. Возбудителем этого потенциально смертельного заболевания является *Vibrio cholerae* - грам-отрицательная бактерия с одним жгутиком, с помощью которого она движется. Основное клиническое проявление холеры - сильнейший понос (диарея). В течение нескольких часов организм может потерять несколько литров жидкости, и если потерю жидкости не возместить, то развивается шок и наступает смерть. Диарея обусловлена не прямым действием бактерии, а бактериальным токсином. Холерный токсин (называемый также холерагеном) повышает активность аденилатциклазы в слизистой тонких кишок, которая в свою очередь повышает содержание cAMP в клетках, причем до исключительно высокого уровня. Последнее стимулирует активный транспорт ионов в кишечном эпителии, вследствие чего резко возрастает выход Na^+ и воды в полость кишечника.

Холерный токсин - белок массой 87 кДа; он состоит из A_1 и A_2 -пептидов, соединенных дисульфидным мостиком, и пяти В-пептидов. Токсин проникает в клетку путем взаимодействия с ганглиозидом G_M1 (разд. 20.7) на ее поверхности. Этот богатый углеводами сфинголипид узнают В-цепи токсина. Попадая в клетку, A_1 -субъединица (23 кДа) ковалентно модифицирует G-белок, регулирующий активность аденилатциклазы. В частности, A_1 -субъединица токсина катализирует перенос ADP-рибозы от NAD на боковую цепь аргинина G-белка (рис. 35.8). Это ADP-рибозилирование блокирует GTP-азную активность G-белка. Другими словами, модифицированный G-белок лишается встроеного в него устройства для инактивации аденилатциклазы (см. рис. 35.5). По существу, G-белок оказывается стабилизированным в GTP-форме, а аденилатциклаза - в непрерывно активированном состоянии, несмотря на отсутствие гормона. Аналогичный эффект можно получить *in vitro* путем добавления к немодифицированному G-белку гуанилилимидофосфата - негидролизуемого аналога GTP.

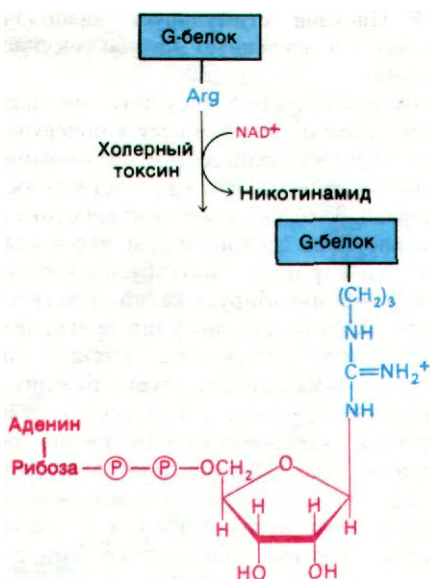


Рис. 35.8. Холерный токсин катализирует ADP-рибозилирование G-белка - регулятора активности аденилатциклазы.

Этот аналог, подобно GTP, активирует G-белок, но не способен превращаться в GDP. Связывание гуанилилимидофосфата с немодифицированным G-белком так же активирует аденилатциклазу, как связывание GTP G-белком, утратившим GTPазную ак-



тивность. Действие холерного токсина еще раз доказывает значение GTPазной активности G-белка. Вспомним, что вредоносное действие дифтерийного токсина также обусловлено ADP-рибозилированием белка с GTPазной активностью (разд. 29.28).

35.8. Инсулин стимулирует анаболические процессы и ингибирует катаболические процессы

Обратимся теперь к инсулину - полипептидному гормону, играющему ключевую роль в интеграции процессов использования топливных веществ, что уже обсуждалось выше (разд. 23.6). Общая характеристика функции инсулина состоит в том, что в мышцах печени и жировой ткани он усиливает анаболические и ингибирует катаболические процессы. В частности, инсулин повышает скорость синтеза гликогена, жирных кислот, белков, а также стимулирует гликолиз. Важное значение имеет такой аспект действия гормона, как *стимуляция проникновения глюкозы, ряда других сахаров, а также аминокислот в клетки мышц и жировой ткани*. Способствуя входу глюкозы в указанные клетки, гормон снижает ее содержание в крови (так называемый *гипогликемический эффект*). Инсулин ингибирует такие катаболические процессы, как распад гликогена и нейтрального жира. Он тормозит также гликонеогенез путем снижения уровня ферментативной активности пируват-карбоксилазы и фруктозо-1,6-бисфосфатазы. Действие инсулина во многом противоположно действию адреналина и глюкагона. По существу, *адреналин и глюкагон служат сигналами недостаточности глюкозы, тогда как инсулин - сигнал избытка глюкозы*.

35.9. Препроинсулин и проинсулин - предшественники активного гормона

Как показал Фредерик Сангер (Frederick Sanger), бычий инсулин состоит из двух цепей: А-цепи из 21 аминокислотного остатка

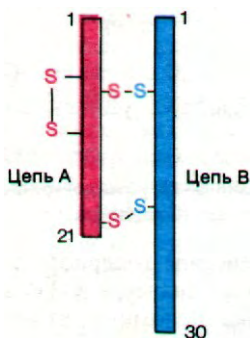


Рис. 35.9. Полипептидные цепи и дисульфидные мостики в инсулине.



Рис. 35.10. Изучение белка с высокой радиоактивностью, выявляемой после импульсного введения метки в аденому островковой ткани поджелудочной железы, привело к открытию проинсулина (непрерывной линией показана радиоактивность, прерывистой - оптическая плотность при 280 нм).

и В-цепи из 30 остатков; цепи инсулина ковалентно связаны между собой двумя дисульфидными мостиками (рис. 35.9). Аналогичное строение имеют инсулины других видов животных, в том числе человека. Как синтезируется этот двухцепочечный белок? *A priori* можно предположить, что А- и В-цепи синтезируются по отдельности, затем они специфически связываются в результате нековалентных взаимодействий и далее между ними формируются правильно расположенные дисульфидные мостики. Такое предположение было проверено экспериментально; для этого определяли, можно ли из восстановленных А- и В-цепей получить *in vitro* активный гормон с правильным расположением дисульфидных мостиков. Стимулом для этого исследования послужили данные Анфинсена (Anfinsen), посвященные рибонуклеазе - одноцепочечному белку, способному к полной ренатурации после химического восстановления и развертывания структуры (разд. 2.12). Однако в случае инсулина был получен совершенно иной результат: менее 4% образованных *in vitro* молекул содержали правильные дисульфидные пары. Такой же низкий выход ренатурированного белка имел место и в случае с химотрипсином - трехцепочечным ферментом, имеющем две межцепочечные дисульфидные связи (разд. 8.2). С другой стороны, химотрипсиноген - одноцепочечный пред-

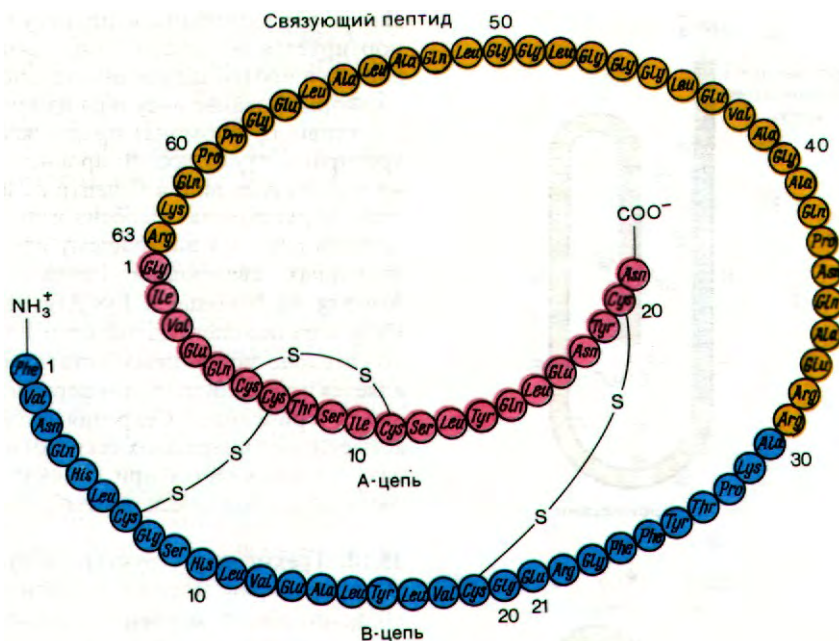


Рис. 35.11. Последовательность аминокислот в проинсулине свиньи; А-цепь инсулина показана красным цветом, В-цепь - синим, связующий пептид (С-пептид) - желтым. [Chance R.E., Ellis R.M., Bromer W.W.. Science, 161, 165 (1968).]

шественник химотрипсина - восстанавливал свою структуру в значительно большей мере. Различие в поведении химотрипсина и химотрипсинагена наводило на мысль о том, что и инсулин не восстанавливал структуры должным образом из-за частичного отсутствия необходимой для этого информации. Возник вопрос, не является ли инсулин, подобно химотрипсину, производным одной полипептидной цепи?

Решающую роль в изучении этой проблемы сыграла работа Доналда Стайнера (Donald Steiner), проведенная на аденоме островковой ткани поджелудочной железы. Эта редко встречающаяся опухоль человека продуцирует большие количества инсулина. Стайнер инкубировал срезы опухоли с меченным тритием лейцином и далее проводил анализ. Таким путем был обнаружен новый включавший большое количество метки белок (рис. 35.10). Последующие исследования показали, что этот белок, названный *проинсулином*, служит *предшественником* инсулина.

Проинсулин представляет собой единую полипептидную цепь, в которой есть последовательность примерно из 30 аминокислот, отсутствующая в инсулине (рис. 35.11). Это *связующий пептид* (C-пептид от англ. connecting - связующий); он расположен между карбоксильным концом В-цепи и аминоконцом А-цепи будущего инсулина. Как и предполагалось, *проинсулин обладает способностью к формированию правильно расположенных дисульфидных связей после обработки восстанавливающими агентами и последующего повторного окисления*.

Недавно проведенные исследования биосинтеза инсулина выявили, что проинсулин - это еще не исходная форма синтезированного гормона. Новообразованная полипептидная цепь, попадающая в просвет шероховатого эндоплазматического ретикула, представляет собой так называемый *препроинсулин*, который содержит N-концевую последовательность из 16 остатков, отсутствующую в проинсулине. По-видимому, этот N-концевой гидрофобный участок служит сигнальной последовательностью, направляющей новообразованную цепь в эндоплазматический ретикулум (разд. 29.30). Превращение *препроинсулина* в *проинсулин* происходит в просвете трубочек эндоплазматического ретикула вскоре после прохождения *препроинсулина* через мембрану.

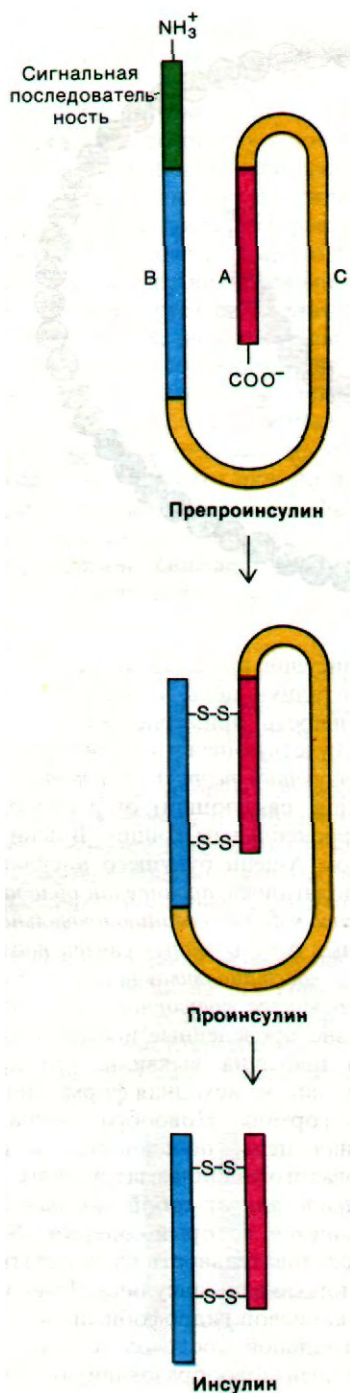


Рис. 35.12. Ферментативное превращение препроинсулина в проинсулин и далее в инсулин.

Далее образовавшийся проинсулин транспортируется в аппарат Гольджи, где начинается протеолиз соединительного пептида. Формирование инсулина из проинсулина (неактивного гормона) продолжается в секреторных гранулах. В проинсулинах животных разных видов С-пептиды имеют общие структурные особенности. Так, во всех изученных к настоящему времени проинсулинах связующий пептид содержит Arg-Arg на N-конце и Lys-Arg на С-конце. Гидролиз полипептидной цепи по этим положительно заряженным остаткам осуществляется протеолитическим ферментом, сходным с трипсином. Секреция инсулина, накопленного в созревших секреторных гранулах, осуществляется при слиянии мембран гранул с плазматической мембраной клетки.

35.10. Трехмерная структура инсулина

В лаборатории Дороти Ходжкин (Dorothy Hodgkin) было проведено рентгеноструктурное исследование инсулина свиньи и раскрыта его трехмерная пространственная структура при разрешении 1,9 А. Эта работа была завершена почти через 36 лет после того, как Ходжкин получила первые рентгенограммы кристалла белка (пепсина), будучи студенткой-дипломницей в лаборатории Джона Бернала (John Bernal). За прошедшие годы Ходжкин расшифровала структуры та-

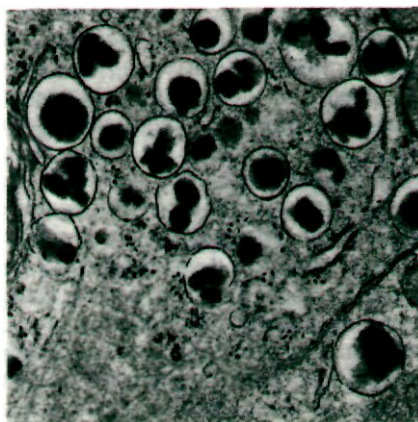


Рис. 35.13. Электронограмма содержащих инсулин секреторных гранул в β -клетках поджелудочной железы. Инсулин образует в гранулах мелкие кристаллы, что обусловлено его высокой концентрацией в этих структурах. (Печатается с любезного разрешения д-ра Arthur Like.)

ких биологически важных веществ, как холестерол, пенициллин и витамин В₁₂. Инсулин оказался компактным трехмерным образованием (рис. 35.14), из которого «торчат» только N- и C-концы В-цепи. Между этими двумя вытянутыми ветвями В-цепи располагается А-цепь. Структура имеет неполярную сердцевину, образованную обращенными внутрь алифатическими боковыми цепями остатков аминокислот, принадлежащих А- и В-цепям. Помимо дисульфидных мостиков, инсулин стабилизирован несколькими солевыми связями, а также водородными связями между определенными группами А- и В-цепей. Конформация проинсулина еще не исследована, но, судя по данным спектроскопии, она очень сходна с конформацией инсулина. Об этом же свидетельствует способность проинсулина кристаллизоваться вместе с инсулином.

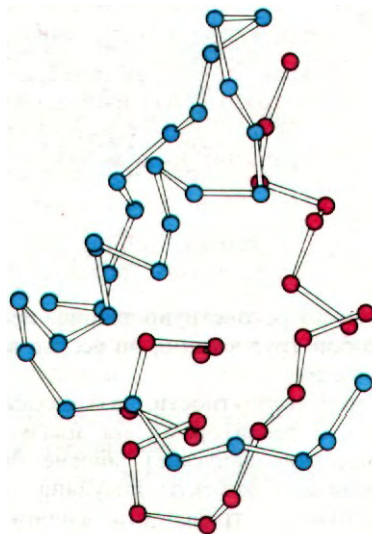


Рис. 35.14. Схематическое изображение структуры инсулина; показаны только α-углеродные атомы. Красным обозначена А-цепь. синим - В-цепь.

35.11. Рецепторы инсулина локализованы в плазматической мембране клеток-мишеней

Инсулин прочно связывается со специфическими рецепторами на плазматической мембране клеток-мишеней. Это выявляется в опытах с использованием радиоактивного инсулина, содержащего ковалентно связанный ¹²⁵I. Константа диссоциации инсулин-рецепторного комплекса составляет около 10⁻¹⁰ М. Необходимость в столь прочном связывании объясняется низкой концентрацией инсулина в крови (порядка 10⁻¹⁰ М). Константа скорости образования комплекса очень велика (около 10⁷ М⁻¹·с⁻¹) и приближается к величине, характеризующей реакции, скорость которых регулируется только скоростью диффузии. Клетка жировой ткани содержит всего лишь 1·10⁴ рецепторов инсулина, что соответствует плотности один рецептор на квадратный микрометр плазматической мембраны. Иными словами, один рецептор инсулина приходится на 1·10⁶ фосфолипидов мембраны.

Параметры связывания инсулина с солюбилизованным рецептором и с рецептором в интактной плазматической мембране одинаковы. Солюбилизованные рецепторы были очищены методом аффинной хроматографии, т.е. методом, основанным на использовании специфических связывающих свойств рецептора. Для очистки препарат солюбилизованных мембран пропускали через колонку агарозы с ковалентно присоединенным инсу-

лином; рецепторы инсулина прочно связывались с колонкой, тогда как остальные компоненты смеси проходили сквозь колонку. Далее рецепторы инсулина элюировали подкисленным раствором мочевины, который вызывал денатурацию рецепторов и их отделение от связанного с агарозой инсулина. По счастью, очищенные рецепторы удавалось затем ренатурировать путем удаления мочевины и повышения pH раствора. Используя этот метод, Педро Кватрескасас (Pedro Cuatrecasas) очистил рецепторы инсулина в 250000 раз. Субъединица рецептора, связывающего инсулин, представляет собой гликопротеин массой 135 кДа (рис. 35.15).

На долю рецепторов инсулина приходится всего лишь 4·10⁻³% общего количества мембранных белков в гомогенате печени. Следовательно, чтобы получить в чистом виде 1 мг белка-рецептора, необходимо подвергнуть обработке количество гомогената, эквивалентное 500 г белка, а для этого нужно взять печень от 200 крыс. Этот расчет показывает, что выделение рецепторов в количестве, достаточном для определения последовательности аминокислот, рентгеноструктурного анализа

Диабет -

название указывает на повышенное мочеиспускание. Аретей, каппадокийский врач второго столетия н.э., писал: «Эпитет «диабет» относится к состоянию, похожему на прохождение воды по сифону». Он с тонкой наблюдательностью охарактеризовал диабет как «растворение плоти и конечностей и превращение их в мочу».

Сахарный -

(по латыни mellitus, т.е. «подслащенный медом») указывает на присутствие сахара в моче больных диабетом.

и опытов по реконструированию, представляет собой трудоемкую, но все же выполнимую задачу.

По всей вероятности, взаимодействие инсулина с рецепторами на плазматической мембране запускает многие быстро развивающиеся эффекты инсулина, например активацию транспорта аминокислот

и глюкозы через мембрану. К числу быстро развивающихся эффектов инсулина относится также фосфорилирование белка, принадлежащего рибосомной 40S-субчастице. Все эти эффекты гормона не связаны с изменением содержания сАМР. Какие вещества опосредуют действие инсулина в клетке, пока еще не установлено.

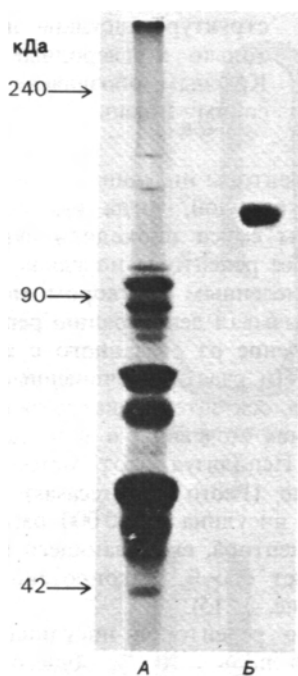


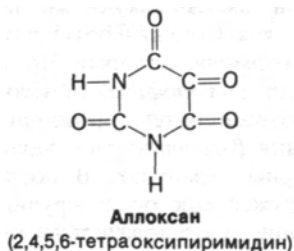
Рис. 35.15. Гель-электрофорез экстракта плазматических мембран клеток печени (А) и очищенного рецептора инсулина (Б). Электрофорез проводился в денатурирующих условиях. [Jacobs S., Nazum E., Schechter Y., Cuatrecasas P., Proc. Nat. Acad. Sci., 76, 4919 (1979).]

35.12. Недостаточность инсулина вызывает диабет

Сахарный диабет - это сложное заболевание, которым страдают несколько сот миллионов людей. Диабет характеризуется повышенным уровнем глюкозы в крови и в моче. Выделение глюкозы с мочой наступает в условиях, когда содержание глюкозы в крови превышает способность почечных канальцев к реабсорбции. Вместе с глюкозой выделяется много воды, так что нелеченый больной в острой стадии заболевания испытывает голод и жажду. Потеря глюкозы приводит к израсходованию запасов углеводов, а затем и к расщеплению жиров и белков. В результате мобилизации жиров образуется большое количество ацетил-СoА. Если ацетил-СoА не может полностью использоваться в цикле трикарбоновых кислот из-за недостаточного количества оксалоацетата, то образуются кетоновые тела (ацетоацетат, ацетон и гидроксимасляная кислота). Вспомним, что в организме животных синтез оксалоацетата из ацетил-СoА не происходит; у животных оксалоацетат образуется из глюкозы и некоторых аминокислот (разд. 23.4). Выделение кетоновых тел нарушает кислотно-щелочное равновесие и усиливает обезвоживание организма. В итоге в острой стадии диабета у нелеченого больного может развиваться кома и наступить смерть.

Сахарный диабет обусловлен недостаточностью инсулина. Причины же недостаточности инсулина в большинстве случаев неизвестны. Диабет удается воспроизвести

у экспериментальных животных путем хирургического удаления значительной части поджелудочной железы либо путем химического разрушения β -клеток. Эти продуцирующие инсулин клетки избирательно разрушаются при введении аллоксана. Диабет можно также вызвать введением антител против инсулина. Еще одно дока-



зательство той важной роли, которую играет инсулиновая недостаточность в развитии диабета, состоит в том, что введение инсулина быстро снимает острые симптомы диабета.

Почему у больного диабетом количество инсулина оказывается ниже потребностей в нем тканей? *В настоящее время установлено, что в основе клинического состояния, называемого сахарным диабетом, может лежать множество различных молекулярных дефектов.* Рассмотрим некоторые из причин диабета.

1. *Нарушение превращения проинсулина в инсулин.* В результате мутаций, затрагивающих остатки аминокислот в участке соединения А-цепи (или В-цепи) с С-пептидом в проинсулине, может нарушиться его превращение в инсулин. У таких больных в плазме крови обнаруживается высокий уровень содержания проинсулина (не обладающего гормональной активностью).

2. *Нарушение молекулярной структуры инсулина.* Еще один тип мутаций приводит к замене аминокислотного остатка в критически важном участке молекулы инсулина. Так, если произошла замена фенилаланина на лейцин вблизи карбоксильного конца В-цепи, то гормональная активность такого инсулина оказывается сниженной в 10 раз. Любопытно, что этот участок молекулы инсулина сохраняется неизменным в эволюции, начиная с примитивных миксов и до человека.

3. *Дефект рецепторов инсулина.* У некоторых больных секретируется нормальный инсулин, но нарушается его связывание с клетками-мишенями. Следовательно,

в этом случае имеет место дефект рецепторов инсулина в плазматических мембранах.

4. *Нарушение сопряжения рецепторов инсулина.* Бывают случаи, когда у больных секретируется нормальный инсулин, клетки-мишени содержат обычное число рецепторов инсулина и параметры связывания гормона рецептором также соответствуют норме. По-видимому, у этих больных нарушения локализованы внутри клетки. Возможно, в частности, что отсутствует сопряжение между инсулин-рецепторным комплексом и следующим компонентом в цепи передачи гормонального сигнала.

35.13. Эндорфины - пептиды мозга, действующие подобно опиатам

На протяжении веков опиаты, в частности морфин, использовались как болеутоляющие средства. В 1680 г. Томас Сиденхем (Thomas Sydenham) писал: «Среди всех лекарств, которые всевышний даровал человеку, дабы облегчить его страдания, нет более универсального и более действенного, чем опиум». Но почему в мозгу позвоночных содержатся рецепторы к алкалоидам из семян мака? Нейрофармакологи предположили, что опиатные рецепторы предназначены не для взаимодействия с растительными алкалоидами, а для восприятия эндогенных регуляторов ощущения боли. Согласно этой точке зрения, морфин оказывает фармакологический эффект только потому, что он имитирует вещества, существующие в организме животного. Вопрос этот был окончательно разрешен в 1975 г., когда Джон Хьюз (John Hughes) выделил из мозга свиньи два пептида с опиатоподобной активностью. Эти сходные между собой пентапептиды, названные *метионин-энкефалином* и *лейцин-энкефалином*, присутствуют в большом количестве в некоторых нервных окончаниях. По-видимому, они участвуют в интеграции сенсорной информации, имеющей отношение к боли.

Спустя год Роджер Гилемин (Roger Guillemin) выделил из промежуточной доли гипофиза более длинные пептиды — *эндорфины*. Эндорфины обладают почти такой же способностью снимать ощущение боли, как морфин (при той же концентрации). Введение эндорфинов в желудочки мозга лабораторным животным оказывает

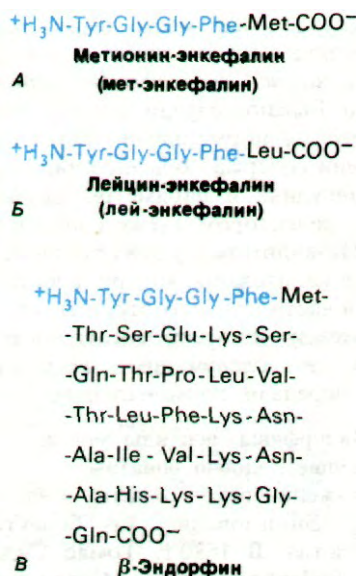


Рис. 35.16. Последовательности аминокислот метионин-энкефалина (А), лейцин-энкефалина (Б) и β-эндорфина (В). Синим цветом показана общая для них тетрапептидная последовательность.

примечательное действие. Так, β-эндорфин на несколько часов индуцирует глубокую анальгезию всего тела, причем в этот период понижается температура тела. Более того, у животных возникает ступор, и они лежат распластавшись. Спустя несколько часов действие эндорфинов исчезает, и животные вновь ведут себя нормально. Выяснился также удивительный факт, что действие эндорфинов исчезает через несколько секунд после введения *наллоксона* (рис. 35.17), известного антагониста морфина. Судя по поведенческим реакциям, индуцированным эндорфинами, эти пептиды в нормальных условиях участвуют в регуляции эмоциональных ответов. Многие методы, необходимые для проверки этой гипотезы, уже разработаны. Так, для определения крайне малых количеств пептидов, например эндорфинов, используется *радиоиммунологический анализ*, который сочетает чувствительность радиоизотопных методов со специфичностью иммунной реакции. Здесь мы сталкиваемся

с зарождением новой и многообещающей области нейробиологии и нейропсихиатрии.

35.14. При расщеплении проопиокортина образуется несколько пептидных гормонов
Хотя β-эндорфин был открыт недавно, однако последовательность аминокислот в нем оказалась знакомой. В самом деле, β-эндорфин имеет такую же последовательность, как С-концевая область β-*липотропина* - гормона, который Чо Ли (Chou Li) выделил из гипофиза. *In vivo* β-эндорфин образуется путем протеолитического расщепления β-*липотропина*, накопленного в секреторных гранулах. В последующем был обнаружен еще более крупный белок, включающий последовательности β-липотропина и кортикотропина. Этот прогормон (массой 29 кДа) был назван *про-опиокортином*, так как он служит предшественником опиатного гормона и кортикотропина (рис. 35.18). *Кортикотропин* (называемый также *адренокортикотропным гормоном* или *АКТГ*) способствует разрастанию коры надпочечников и стимулирует синтез целого набора стероидных гормонов в этой ткани. Из про-опиокортина образуется два меланоцитстимулирующих гормона (МСГ). Один из них - α-МСГ - является фрагментом кортикотропина, а второй - β-МСГ - формируется из β-липотропина (рис. 35.18). Не исключено, что N-концевая половина про-опиокортина служит источником и других гормонов. Из изложенного ясно, что *пептидные гормоны образуются из про-опиокортина, как из рога изобилия*. Этот прогормон состоит из четырех гомологичных областей, которые,

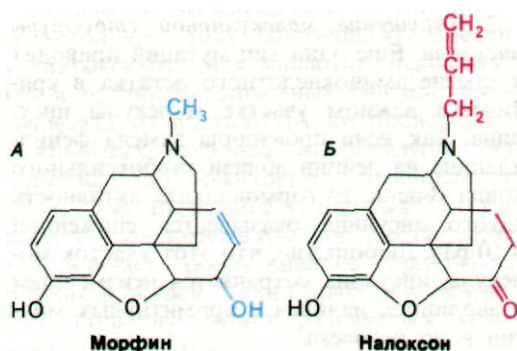


Рис. 35.17. Структура морфина - опиата (А) и налоксона - антагониста морфина (Б).

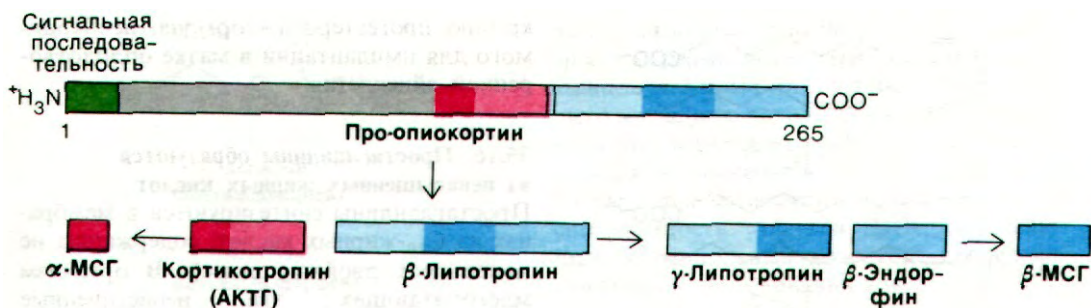


Рис. 35.18. Про-опиокортин - биосинтетический предшественник нескольких пептидных гормонов.

видимо, возникли путем последовательных удвоений гена.

Участки соединения между будущими активными гормонами в про-опиокортине содержат пары основных остатков (Lys-Arg, Arg-Arg или Lys-Lys). Следует подчеркнуть, что границы С-пептида в проинсулине (см. рис. 35.11) и в пропаратормоне также представлены парами основных остатков. Видимо, именно пары основных остатков в различных прогормонах служат теми отметинами, которые указывают, в каких участках должно произойти последующее расщепление.

35.15. Простагландины - модуляторы действия гормонов

Обратимся теперь к простагландинам - группе жирных кислот, оказывающих влияние на разнообразнейшие физиологические процессы. Эти соединения были открыты в 30-х годах, но внимание привлекли только недавно, главным образом благодаря работам Суне Бергстрема (Sune Bergstrom). Простагландины - это 20-углеродные жирные кислоты, содержащие 5-углеродное кольцо. Основные классы простагландинов обозначаются как ПГ-А, ПГ-В, ПГ-Е и ПГ-Ф, причем внизу дополнительно ставится цифра, указывающая на число углерод-углеродных двойных связей в углеводородной цепи (вне кольца). Простагландины, по-видимому, не являются гормонами, но модулируют действие гормонов. Обычно они изменяют активность тех клеток, в которых синтезировались. Характер действия простагландинов зависит от типа клетки, и этим они отличаются от гормонов с их однозначно определенным эффектом.

Подробно исследован механизм действия ПГ-Е₁ на расщепление жиров в жировой ткани. Такие гормоны, как адреналин, глюкагон, кортикотропин и тиреотропин, стимулируют липолиз в клетках. ПГ-Е, в концентрации 10^{-8} М является сильным ингибитором их липолитического эффекта. Непосредственное отношение к этому имеет тот факт, что ПГ-Е₁ претот-

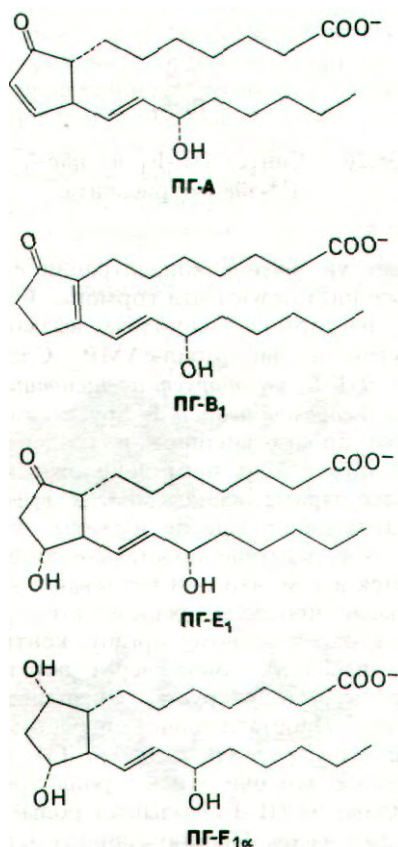


Рис. 35.19. Структура ряда простагландинов.

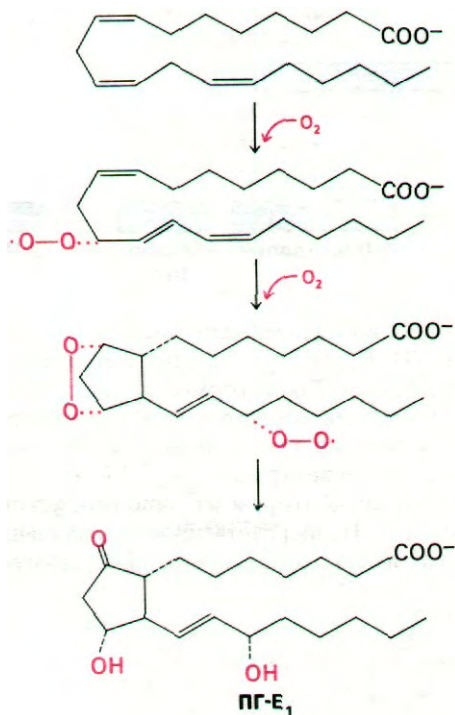


Рис. 35.20. Синтез ПГ-Е₁ из *цис*-Δ⁸, Δ¹¹, Δ¹⁴-эйкозотриеноата.

вращает увеличение концентрации сАМР, которое индуцируют эти гормоны. Однако ПГ-Е₁ не тормозит липолиза, вызванного добавлением дибутирил-сАМР. Следовательно, ПГ-Е₁ *ингибирует аденилатциклазу клеток жировой ткани*. В других клетках влияние простагландинов на содержание сАМР может быть противоположным.

Молекулярные основы многих эффектов простагландинов еще не изучены. Физиологическое действие простагландинов выражается в том, что они усиливают воспалительные процессы, регулируют приток крови к определенному органу, контролируют транспорт ионов через некоторые мембраны, модулируют синаптическую передачу. Простагландины представляют большой интерес для клиники. Так, предполагается, что они играют роль при родах. Вливание ПГ-Е₂ вызывает роды через несколько часов. Простагландины в принципе могут быть использованы как контрацептивы; показано, что ПГ-Е_{2α} снижает се-

крецию прогестерона - гормона, необходимого для имплантации в матке оплодотворенной яйцеклетки.

35.16. Простагландины образуются из ненасыщенных жирных кислот

Простагландины синтезируются в мембранах из С₂₀-жирных кислот, содержащих не менее трех двойных связей. В организме млекопитающих эти ненасыщенные жирные кислоты поступают с пищей (разд. 17.23). Предшественники простагландинов высвобождаются из фосфолипидов мембран под действием фосфолипаз. Биосинтез ПГ-Е₁, например, начинается с *цис*-Δ⁸, Δ¹¹, Δ¹⁴-эйкозотриеноата. Образование цикlopentанового кольца и включение трех атомов кислорода осуществляются *простагландин-синтазой* (называемой также *простагландин-циклооксигеназой*). Как и предполагалось *a priori*, источником всех трех атомов кислорода служит молекулярный кислород (рис. 35.20). Гем-содержащий фермент диоксигеназа, катализирующий эти реакции, связан с гладким эндоплазматическим ретикулулом.

Как показал Джон Вейн (John Vane), *аспирин тормозит биосинтез простагландинов путем инактивирования простагландин-синтазы*. Причина угнетения активности этого фермента аспирином (ацетилсалицилатом) заключается в том, что он ацетилирует концевую аминогруппу одной из субъединиц простагландин-синтазы (рис. 35.21). Простагландины усиливают воспалительные процессы, тогда как аспирин подавляет их. По-видимому, такое фармакологическое действие аспирина обусловлено тем, что он ингибирует биосинтез простагландинов.

35.17. Стероидные гормоны активируют специфические гены

Первичный эффект стероидных гормонов, в частности эстрадиола, прогестерона и кортизона, состоит в воздействии на *выражение генов*, а не непосредственно на активность ферментов или процессы транспорта. В отличие от адреналина эти стероидные гормоны оказывают свое действие, только проникнув в клетку-мишень. Кроме того, местом их первичного действия служит не плазматическая мембрана, а *клеточное ядро*. Для полного проявления биологического эффекта стероидных гормонов требуются часы, а не минуты, поскольку он зависит от *синтеза новых белков*. Актиномицин D тормозит

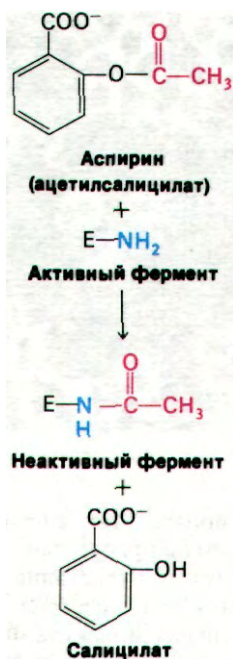
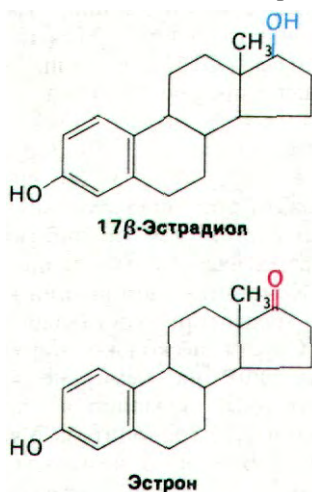


Рис. 35.21. Инактивация простагландин-синтазы аспирином.

действие указанных стероидов, из чего следует, что оно связано с синтезом новой мРНК.

17 β -эстрадиол стимулирует увеличение матки. Первый этап этого воздействия состоит в том, что гормон связывается со специфическим рецептором в цитоплазме клеток матки. Связывание характеризуется высокой прочностью ($K \approx 10^{-9}$ М). Образовавшийся гормон-рецепторный комплекс мигрирует далее в клеточное ядро. В резуль-



тате связывания рецептора с эстрадиолом сродство рецептора к ДНК значительно повышается. Кроме того, у рецептора, связавшего эстрадиол, появляется вторая субъединица. Последнее находит отражение в увеличении коэффициента седimentации с 4S до 5S. Остается неизвестным, чем определяется специфичность участков ДНК, связывающих эстрадиольный рецептор: последовательностью ли оснований или белками хромосом. Взаимодействие гормон-рецепторного комплекса с ДНК высокоспецифично. Кроме того, строго специфична и активация рецептора путем связывания гормона. К рецептору эстрадиола может присоединиться эстрон, но этот комплекс не взаимодействует с ДНК. Неспособность эстрон-рецепторного комплекса к связыванию с ДНК вполне согласуется с тем, что эстрон не стимулирует увеличения матки.

По-видимому, описанный механизм развития гормонального эффекта характерен не только для эстрадиола, но и в целом для всех стероидных гормонов. Так, в опытах с культурой ткани гепатомы было показано, что глюкокортикоидный стероидный гормон дексаметазон тоже связывается со специфическим цитоплазматическим рецептором; рецептор, связавший гормон, претерпевает конформационные изменения и затем мигрирует в клеточное ядро, где образует комплекс со специфическими

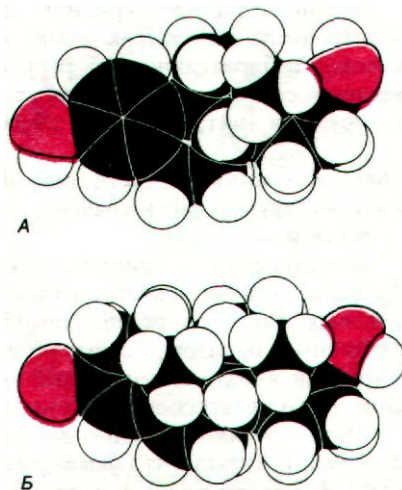
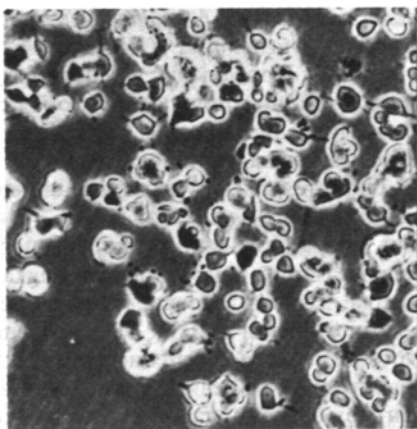
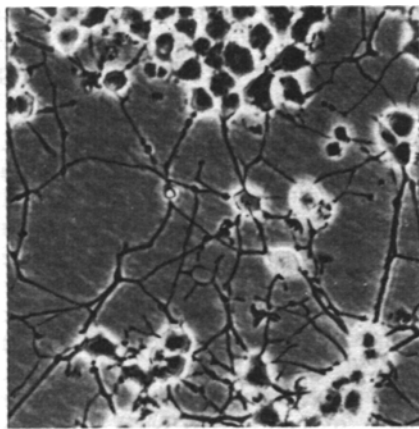


Рис. 35.22. Пространственные модели 17 β -эстрадиола (А) и тестостерона (Б).



А



Б

Рис. 35.23. Фактор роста нервов (ФРН) индуцирует отрастание аксонов от культивируемых нервных клеток. *А* - без ФРН; *Б* - в присутствии ФРН. (Печатается с любезного разрешения Bruce Yankner, Christiana Richters-Landsberg и д-ра Erick Shooter.)

участками в ДНК. Число участков ДНК, связывающих этот рецептор, определено равным $1 \text{ на } 10^6$ пар оснований. Полученное число согласуется с данными о том, что дексаметазон влияет на транскрипцию лишь небольшого числа генов. Каков механизм этой высокой избирательности в регуляции транскрипции со стороны стероидных гормонов, остается интригующей загадкой.

35.18. Белковые факторы роста типа ФРН и ЭФР стимулируют пролиферацию клеток-мишеней

Как регулируется рост эукариотических клеток? Проведенное в последние годы выделение белковых факторов роста, способных специфическим образом стимулировать клетки-мишени, внесло существенный вклад в решение этого интересного и важного вопроса. Рита Леви-Монтальчини (Rita Levi-Montalcini) открыла, что *фактор роста нервов (ФРН) играет решающую роль в развитии симпатических нейронов и определенных сенсорных нейронов у позвоночных*. Под влиянием ФРН начинается деление

и дифференцировка этих клеток. Чувствительным тестом на присутствие фактора роста нервов служит отрастание аксонов от культивируемых ганглиев (рис. 35.23). Биологически активная молекула ФРН состоит из двух идентичных полипептидных цепей массой по 13 кДа. Этот димер (называемый β -субъединицей) накапливается в месте своего синтеза - поджелудочной железе - в виде комплекса, имеющего субъединичную структуру $\alpha\gamma\beta$ и массу 130 кДа. γ -Субъединица является протеолитическим ферментом, а α -субъединица - ингибитором этой протеиназы. ФРН синтезируется в виде состоящего из α - и β -субъединиц прогормона, который в последующем расщепляется γ -протеиназой. По последовательности аминокислот ФРН напоминает инсулин. Следует отметить, что инсулин не только сильно активирует анаболические процессы в мышцах, печени и жировой ткани, но и оказывает стимулирующий эффект на рост большинства клеток. Можно предположить, что гены ФРН и инсулина произошли от общего предшественника.

Был выделен и изучен также *эпидермальный фактор роста (ЭФР)*. Это полипептид массой 6 кДа (рис. 35.24), способный стимулировать рост эпидермальных и эпителиальных клеток. ЭФР прочно связывается на плазматической мембране клеток-мишеней. Константа диссоциации комплекса ЭФР-рецептор составляет около 10^{-10} М. Спустя несколько минут после связывания ЭФР на мембране кластеры ЭФР-рецепторных комплексов попадают внутрь клетки путем эндоцитоза. Участками эндоцитоза являются так называемые окаймленные ямки (вдавления мембраны), со-

держащие клатрин (разд. 29.32). Далее пузырьки с ЭФР сливаются с лизосомами. Аналогичным образом попадают внутрь клеток и ФРН-рецепторные комплексы (рис. 35.25). Остается неизвестным, насколько необходим собственно процесс проникновения этих комплексов в клетку для передачи стимулирующего сигнала клеточному ядру.

Заключение

Гормоны - это группа химически разнородных соединений, которые интегрируют активность различных клеток в многоклеточном организме. Решающую роль в действии многих гормонов (например, адреналина или глюкагона) играет сАМР, который служит вторым посредником внутри клетки-мишени. Гормоны, действие которых опосредовано сАМР, связываются со специфическими рецепторами на плазматической мембране клетки-мишени и активируют аденилатциклазу. Последняя представляет собой связанный с мембраной фермент, катализирующий синтез сАМР и АТР. Сопряжение между рецепторами гормонов и аденилатциклазой осуществляет белок, связывающий гуаниннуклеотиды (G-белок). Активация аденилатциклазы приводит к увеличению содержания сАМР в клетке. Образовавшийся сАМР активирует в свою очередь протеинкиназу, которая фосфорилирует один или несколько белков. Так, фосфорилирование гликоген-синтазы и киназы фосфоорилазы в мышцах и печени ведет к ингибированию синтеза и активации распада гликогена. Этот каскад реакций многократно усиливает первоначальный гормональный стимул. сАМР появился на ранних этапах эволюции, первоначально как сигнал голодания. Холерный токсин катализирует ADP-рибозилирование G-белка, что приводит к стойкой активации аденилатциклазы в клетках кишечного эпителия. В результате при холере происходит массивный выход Na^+ и воды в полость кишечника.

Инсулин активирует анаболические процессы (синтез гликогена, жирных кислот и белков) и тормозит катаболизм (в частности распад гликогена и жиров). Инсулин оказывает сильнейшее воздействие на процессы мембранного транспорта; в частности, он стимулирует вход глюкозы и аминокислот в клетки мышечной и жировой ткани. Биосинтетическими предшественниками активного гормона служат препроин-

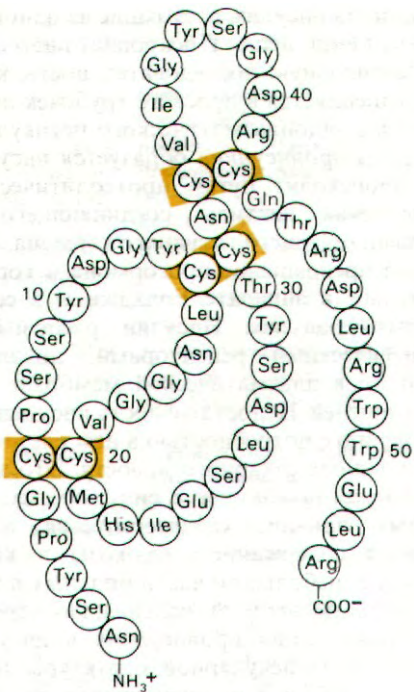


Рис. 35.24. Последовательность аминокислот в эпидермальном факторе роста (ЭФР). [Savage C. R., Hersh J.H., Cohen S., J. Biol. Chem., 248, 7669 (1973).]

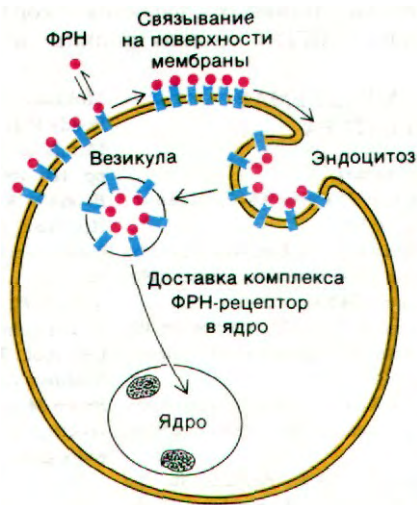


Рис. 35.25. Проникновение в клетку комплекса ФРН-рецептор. (По рисунку, любезно предоставленному д-ром Erick Shooter.)

сулин и проинсулин, состоящие из одной полипептидной цепи. Препроинсулин содержит сигнальную последовательность, которая отщепляется в просвете трубочек шероховатого эндоплазматического ретикулула. Далее из проинсулина образуется инсулин; это происходит путем протеолитического отщепления пептида, соединяющего А- и В-цепи будущего активного гормона. Указанное превращение прогормона в гормон протекает в аппарате Гольджи и в секреторных гранулах. Инсулин распознается специфическими рецепторами, локализованными в плазматической мембране клеток-мишеней. Недостаточность инсулина по сравнению с потребностью в нем клеток лежит в основе сахарного диабета. Это заболевание, возникающее в силу многих различных причин, характеризуется повышенным содержанием глюкозы в крови и моче. У небольшой части больных диабетом обнаружены такие явления, как нарушение превращения проинсулина в инсулин, изменение молекулярной структуры инсулина, а также дефект инсулиновых рецепторов клеточных мембран.

Эндорфины и энкефалины - это пептиды мозга, оказывающие такой же эффект, как опиаты, в частности морфин. β -Эндорфин образуется из про-опиокортина - прогормона, являющегося источником и других биологически активных пептидов: кортикотропина (АКТГ), β -липотропина и ме-

ланоцитстимулирующего гормонов (α - и β -МСГ). Участки соединения между будущими гормонами в про-опиокортине, как и в проинсулине, содержат пары основных аминокислотных остатков. Небольшие по молекулярной массе белки служат также гормонами роста, что видно на примере фактора роста нервов или эпидермального фактора роста. Эти белки стимулируют деление и дифференцировку клеток-мишеней. Время проявления их действия - часы и дни. Аналогично и эффект стероидных гормонов (например, эстрадиола, прогестерона и кортизона) развивается на протяжении нескольких часов или дней. Действие стероидов направлено главным образом на регуляцию выражения генов. Показано, что эстрадиол проникает в клетку-мишень и связывается со специфическим рецептором в цитозоле. К образовавшемуся комплексу присоединяется вторая субъединица белка, после чего весь комплекс попадает в ядро, где происходит его связывание со специфическими участками ДНК. Простагландины, которые синтезируются из полиеновых C_{20} -жирных кислот, модулируют действие различных гормонов, но сами не являются гормонами. Аспирин подавляет синтез простагландинов путем ковалентной модификации фермента, катализирующего включение атомов кислорода в ходе биосинтеза простагландинов.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Pastan I., 1972. Cyclic AMP, *Sci. Amer.*, 227(2), 97-105.

Rubenstein E., 1980. Diseases caused by impaired communication among cells, *Sci. Amer.*, 242(3), 102-121.

Sutherland E.W., 1972. Studies on the mechanism of hormone action, *Science*, 177, 401-408.

Snyder S.H., 1977. Opiate receptors and internal opiates, *Sci. Amer.*, 236(3), 44-56.

Guillemin R., 1978. Peptides in the brain: the new endocrinology of the neuron, *Science*, 202, 390-402.

Рецепторы гормонов

Baxter J.D., *MacLeod K.M.*, 1980.

Molecular basis for hormone action. In: Bondy P. K. and Rosenberg L. E. (eds.), Metabolic Control and Disease, pp. 104-160, Saunders.

Bradshaw R.A., Frazier W.A., 1977. Hormone receptors as regulators of hormone action, *Curr. Top. Cell Regul.*, 12, 1-35.

Kahn C.R., 1976. Membrane receptors for hormones and neurotransmitters, *J. Cell Biol.*, 70, 261-286.

Goldstein J.L., *Anderson R.G.W.*,

Brown M.S., 1979. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis, *Nature*, 279, 679-685.

cAMP и аденилатциклаза

Ross E.M., *Oilman A.G.*, 1980. Biochemical properties of hormone-sensitive adenylate cyclase, *Ann. Rev. Biochem.*, 49, 533-564.

Rodbell M., 1980. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction, *Nature*, 284, 17-22.

Helmreich E.J.M., *Zenner H.P.*, *Pfeuffer T.*, *Cori C.F.*, 1976. Signal transfer from hormone receptor to adenylate cyclase, *Curr. Top. Cell Regul.*, 10, 41-87.

Greengard P., 1978. Phosphorylated proteins as physiological effectors, *Science*, 199, 146-152.

Means A.R., *Dedham J.R.*, 1980. Calmodulin: an intracellular calcium receptor, *Nature*, 285, 73-77.

Холерный токсин

Moss J., *Vaughan M.*, 1979. Activation of adenylate cyclase by cholera toxin, *Ann. Rev. Biochem.*, 48, 581-600.

Hirschhorn N., *Greenough W.B.*, III, 1971. Cholera, *Sci. Amer.*, 225(2), 15-21.

Инсулин и диабет

Czech M.P., 1977. *Molecular basis of*

- insulin action, *Ann. Rev. Biochem.*, 46, 359-384.
- Steiner D.F.*, 1977. Insulin today, *Diabetes*, 26, 322-340.
- Renold A.E., Mintz D.H., Muller W.A., Cahill G.F., Jr.*, 1978. Diabetes mellitus. In: *Stanbury J.B., Wyngaarden J.B. and Fredrickson D.S. (eds.), The Metabolic Basis of Inherited Disease (4th ed.)*, McGraw-Hill.
- Tager H., Given B., Baldwin D., Mako M., Markese J., Rubenstein A., Olefsky J., Kobayashi M., Koltzman O., Poucher R.*, 1979. A structurally abnormal insulin causing human diabetes, *Nature*, 281, 122-125.
- Эндорфины и опиаты**
- Guillemin R.*, 1977. Endorphins: brain peptides that act like opiates, *New Engl. J. Med.*, 296, 226-228.
- Nakanishi S., Inoue A., Kita T., Nakamura M., Chang A.C.Y., Cohen S.N., Numa S.*, 1979. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-*b*-lipotropin precursor, *Nature*, 278, 423-427.
- Snyder S.H.*, 1977. Opiate receptors in the brain, *New Engl. J. Med.*, 296, 266-271.
- Факторы роста**
- Haigler H.T., Cohen S.*, 1979. Epidermal growth factor: interactions with cellular receptors. *Trends Biochem. Sci.*, 4, 132-134.
- Greene L.A., Shooter E.M.*, 1980. The nerve growth factor: biochemistry, synthesis, and mechanism of action, *Ann. Rev. Neurosci.*, 3, 353-402.
- Levi-Montalcini R., Calissano P.*, 1979. The nerve-growth factor, *Sci. Amer.*, **240(6)**, 68-77.
- Стероидные гормоны и витамин D**
- Yamamoto K.R., Alberts B.M.*, 1976. Steroid receptors: elements for modulation of eukaryotic transcription, *Ann. Rev. Biochem.*, 45, 721-746.
- DeLuca H.F.*, 1974. Vitamin D: the vitamin and the hormone, *Fed. Proc.*, **33**, 2211-2219.
- Haussler M.R., McCain T.A.*, 1977. Basic and clinical concepts related to vitamin D metabolism and action, *New Engl. J. Med.*, 297, 974-984, 1041-1049.
- Простагландины**
- Samuelsson B., Granstrom E., Green K., Hamberg M., Hammarstrom S.*, 1975. Prostaglandins, *Ann. Rev. Biochem.*, 44, 669-695.
- Roth G.J., Siok C.J.*, 1978. Acetylation of the NH₂-terminal serine of prostaglandin synthetase by aspirin, *J. Biol. Chem.*, 253, 3782-3784.
- Vane J.R.*, 1971. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs, *Nat. New Biol.*, 231, 232-235.
- Радиоиммунологический метод определения гормонов**
- Yalow R.S.*, 1978. Radioimmunoassay: a probe for the fine structure of biologic systems, *Science*, 200, 1236-1246.
- Общее представление о проблеме**
- Hood L.E., Wilson J.H., Wood W.B.*, 1975. *Molecular Biology of Eucaryotic Cells*, ch. 6, Benjamin.

ГЛАВА 36

Мембранный транспорт

Биологические мембраны представляют собой высокоизбирательные барьеры проницаемости. Поток молекул и ионов между клеткой и окружающей средой строго регулируется специфическими системами транспорта. Транспортные процессы выполняют несколько важных функций.

1. Регулируют объем клетки и поддерживают внутриклеточное значение pH и ионный состав в узких пределах колебаний, что создает благоприятные условия для проявления активности ферментов.

2. Экстрагируют из среды и концентрируют субстраты энергетического и пластического обмена (топливо и строительные блоки), а также выведение токсических веществ.

3. Создают ионные градиенты, что необходимо для поддержания возбудимости нервов и мышц.

В настоящее время начинают выясняться молекулярные механизмы, лежащие в основе многих процессов транспорта. В этой главе мы рассмотрим ряд транспортных систем, обеспечивающих перенос ионов, сахаров и аминокислот через биологические мембраны бактериальных и животных клеток. Мы обсудим также продуцируемые микроорганизмами транспортные антибиотики, поскольку именно анализ их структуры позволил выяснить, каким образом системы транспорта различают такие ионы, как, например, Na^+ и K^+ . Последняя часть этой главы содержит описание каналов, соединяющих содержимое прилежащих друг к другу клеток. Эти протоки (рис. 36.1) играют важную роль в межклеточной коммуникации.

36.1. Различие между пассивным и активным транспортом

Является ли процесс транспорта активным или пассивным, зависит от изменения свободной энергии транспортируемых компонентов. Рассмотрим случай, когда транспортируется незаряженное растворенное вещество (рис. 36.2). Свободная энергия его переноса из отсека 1, где оно находится в концентрации c_1 , в отсек 2, где его концентрация равна c_2 , составляет

$$\Delta G = RT \ln \frac{c_2}{c_1} = 2,303RT \lg \frac{c_2}{c_1}.$$

Для заряженного компонента следует учитывать также электрический потенциал мембраны. Сумма концентрационной и электрической составляющих дает электрохимический потенциал. Изменение свободной энергии в этом случае составит

$$\Delta G = RT \lg \frac{c_2}{c_1} + ZF\Delta V,$$

где Z - электрический заряд транспортируемого компонента, ΔV - мембранная разность потенциалов в вольтах и F - число Фарадея ($23,062 \text{ ккал} \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$).

Если ΔG положительно, то процесс транспорта должен быть активным; если же ΔG отрицательно, то транспорт может осуществляться пассивно. Активный транспорт требует сопряжения с притоком свободной энергии, тогда как пассивный транспорт может идти спонтанно. Рассмотрим для примера транспорт незаряженного вещества из $c_1 = 10^{-3} \text{ мМ}$ в $c_2 = 10^{-1} \text{ мМ}$: $\Delta G = = 2,3RT \lg(10^{-1}/10^{-3}) = 2,3 \cdot 1,98 \cdot 298 \cdot 2 = = + 2,7 \text{ ккал/моль}$. При 25°C (298 К) $\Delta G = = + 2,7 \text{ ккал/моль}$, что указывает на активный транспорт, нуждающийся в притоке свободной энергии. Такой транспортный процесс может протекать за счет, например, гидролиза АТФ, энергия которого составляет $-7,3 \text{ ккал/моль}$ в стандартных условиях.

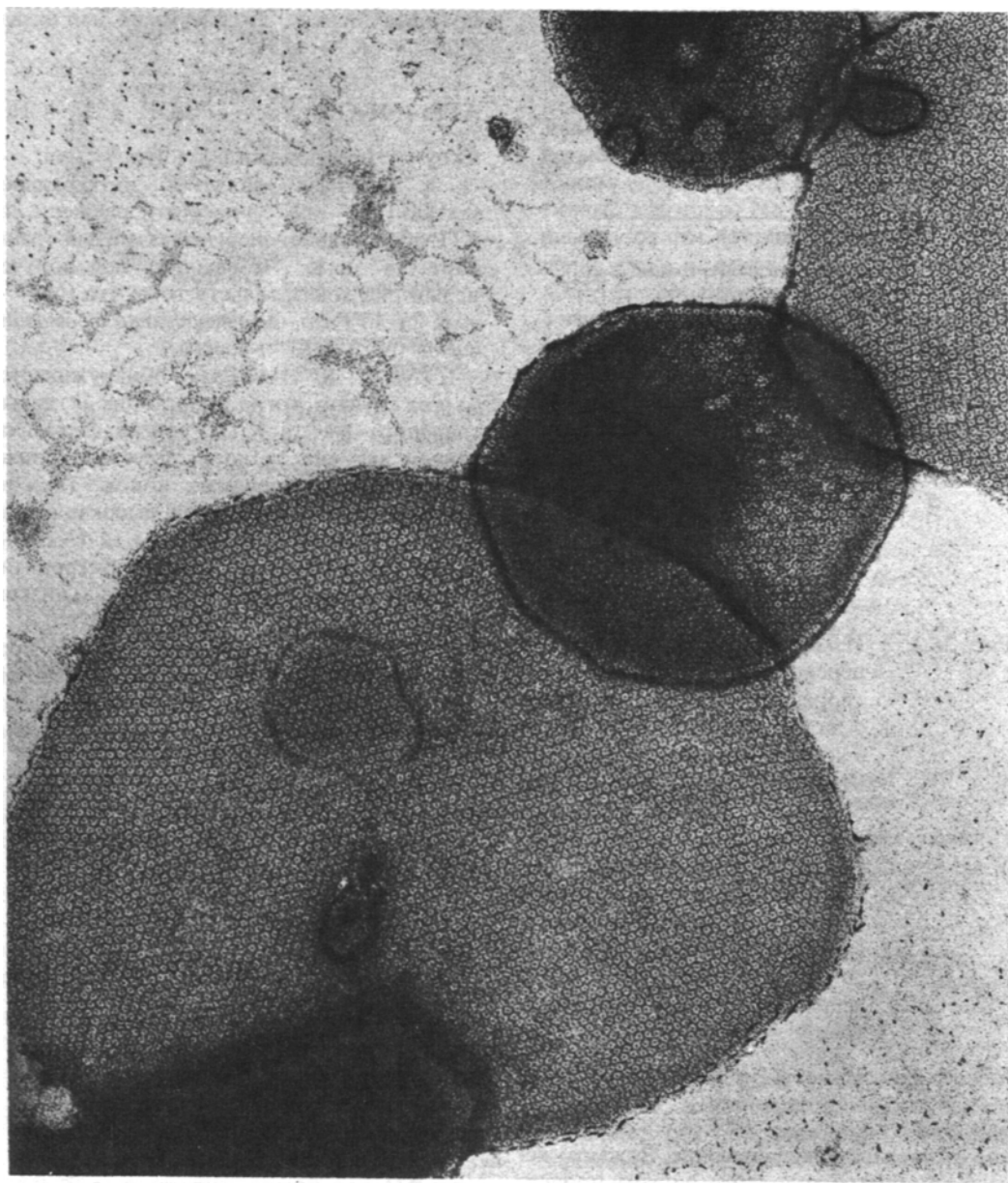


Рис. 36.1. Электронная микрофотография негативно окрашенных межклеточных соединений, выделенных из клеток печени. По таким каналам диаметром 15 А ионы и небольшие молекулы могут перетекать из одной клетки в другую. [Hertzberg E. L., Gilula N. B., J. Biol. Chem., **254**, 2143 (1979).]

36.2. Открытие системы активного транспорта ионов натрия и калия

Большинство животных клеток имеет высокую концентрацию K^+ и низкую концентрацию Na^+ по сравнению с окружающей клетку средой. Градиенты этих ионов создаются специфической транспортной системой, называемой $(Na^+ + K^+)$ -насосом, поскольку движение этих ионов взаимосвязано. Активный транспорт Na^+ и K^+ имеет огром-

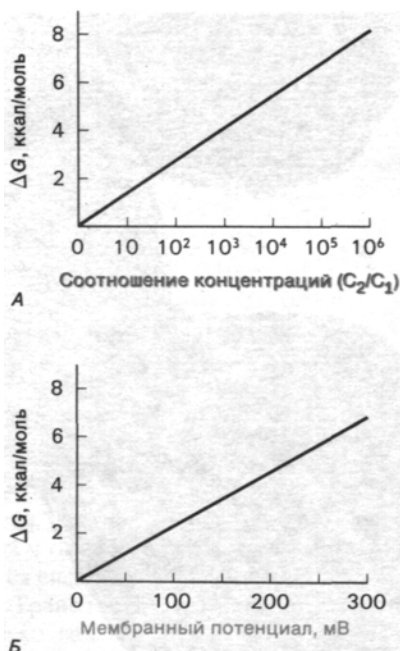
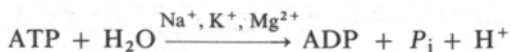


Рис. 36.2. Изменение свободной энергии переноса незаряженного растворенного вещества из отсека с концентрацией c_1 в отсек с концентрацией c_2 (А) и одновалентных ионов через мембрану на сторону, имеющую одноименный с ионом заряд (Б). Обратите внимание, что мембранный потенциал 59 мВ требует для транспорта одновалентного иона при 25°C такого же изменения свободной энергии, как и градиент концентрации, равный 10.

ное физиологическое значение. В самом деле, в организме животного на этот процесс затрачивается более трети АТФ, расходуемой в состоянии покоя. Градиенты концентрации Na^+ и K^+ регулируют объем клетки, обеспечивают электрическую возбудимость нервных и мышечных клеток и служат движущей силой для активного транспорта Сахаров и аминокислот (разд. 36.10).

В 1957 г. Йенс Скоу (Jens Skou) открыл фермент, гидролизующий АТФ только при условии добавления Na^+ и K^+ в содержа-

щую Mg^{2+} среду. Этот фермент был назван ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-АТФазой:



Скоу предположил, что ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-АТФаза является интегральной частью ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-насоса и расщепление АТФ обеспечивает энергией активный транспорт Na^+ и K^+ . С тех пор был получен целый ряд доказательств того, что ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-АТФаза - действительно составная часть ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-насоса.

1. ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-АТФаза обнаруживается во всех случаях, когда происходит активный транспорт Na^+ и K^+ . Уровень ферментативной активности коррелирует с количеством транспортируемых ионов. Так, нервным клеткам свойственна высокая активность и ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-АТФазы, и ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-насоса, тогда как в эритроцитах оба этих показателя находятся на низком уровне.

2. И ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-АТФаза, и насос прочно связаны с плазматической мембраной.

3. ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-АТФаза и насос одинаково ориентированы в плазматической мембране.

4. Изменения концентраций Na^+ и K^+ оказывают одинаковое действие на АТФазную активность и скорость транспорта этих ионов.

5. Кардиотонические стероиды являются специфическими ингибиторами и ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-АТФазы, и ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-насоса. Концентрация ингибитора, оказывающая

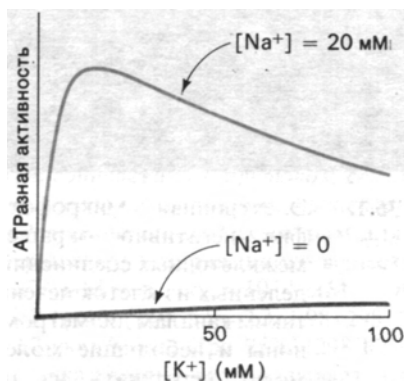


Рис. 36.3. ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-АТФаза [компонент ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-насоса] гидролизует АТФ только в том случае, если в среде, содержащей Mg^{2+} , одновременно присутствуют Na^+ и K^+ .

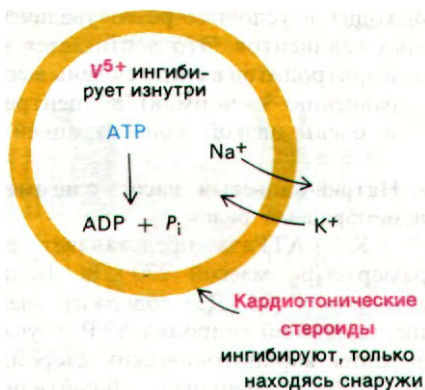


Рис. 36.4. $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -насос строго ориентирован в плазматической мембране.

полумаксимальный эффект, для обоих процессов одинакова.

6. При обращении работы насоса в определенной ионной среде происходит синтез АТФ из АДФ и P_i .

36.3. И фермент, и насос ориентированы в мембране

Исследование $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -насоса в теньх эритроцитов позволило установить, как ориентированы $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -АТРаза и $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -насос. В гипотонической солевой среде эритроцит набухает, и в его мембране появляются дырки. Из него выходит гемоглобин и остается светлая мембрана (тень). Содержимое набухшего эритроцита можно уравновесить с наружной средой. Если наружный раствор сделать изотоничным, то мембрана вновь становится барьером проницаемости. Следовательно, молекулярный и ионный состав среды внутри теней можно отрегулировать путем запечатывания их в соответствующей среде. Исследования процессов транспорта и ферментативной активности в теньх эритроцитов показало, что $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -насос ориентирован следующим образом (рис. 36.4).

1. Для активации АТРаза и переноса через мембрану ионы Na^+ должны быть внутри, а ионы K^+ - снаружи.

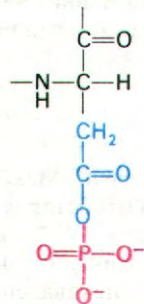
2. Только находящийся внутри клетки АТФ служит эффективным субстратом АТРаза и используется для работы насоса.

3. Кардиотонические стероиды ингибируют насос и АТРаза только в том случае, если они находятся вне клетки (снаружи).

4. Ванадат-ионы ингибируют насос и АТРаза только при условии, что они находятся внутри клетки.

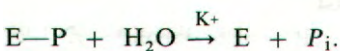
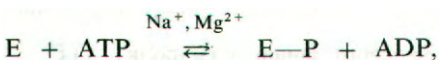
36.4. АТФ транзиторно фосфорилирует натрий-калиевый насос

Каким образом АТФ обеспечивает активный транспорт Na^+ и K^+ ? Ключом к решению этого вопроса оказалось наблюдение, что в присутствии Na^+ и Mg^{2+} АТФ фосфорилирует $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -АТРаза. Участком фосфорилирования служит боковая цепь специфического остатка аспартата. Далее в присутствии K^+ происходит гидролиз фосфорилированного промежуточного продукта ($\text{E}-\text{P}$). Для реакции фосфорили-



β -Аспартилфосфат
(промежуточное соединение $\text{E}-\text{P}$)

рования не требуется K^+ , а для реакции дефосфорилирования не требуются ни Na^+ , ни Mg^{2+} :



Na^+ -зависимое фосфорилирование и K^+ -зависимое дефосфорилирование - не единственные реакции, имеющие критическое значение. В процессе функционирования насос принимает по крайней мере две разные конформации, обозначаемые как E_1 и E_2 . Всего же в транспорте Na^+ и K^+ и сопряженном с ним гидролизе АТФ участвует не менее четырех конформационных форм фермента: E_1 , E_1-P , E_2-P и E_2 (рис. 36.5). При гидролизе одной молекулы АТФ происходит перенос трех ионов Na^+ и двух ионов K^+ . Следовательно, работа насоса генерирует электрический ток через мембрану. Другими словами, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -АТРазный

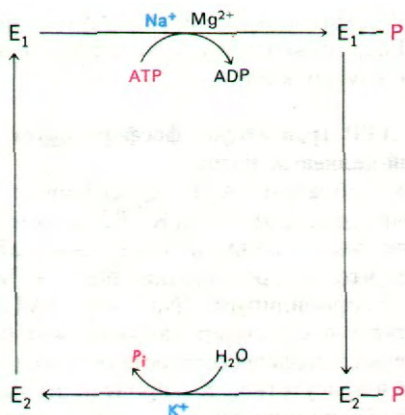


Рис. 36.5. Циклическое изменение конформации $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPазы}$ в ходе катализа.

насос *электрогенен*. Максимальное число оборотов АТРаза составляет около 100 с^{-1} .

Ионы ванадата (V^{5+}) в наномолярных концентрациях ингибируют $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPазу}$. Этот пятивалентный ион фиксирует белок в форме E_2 . Ванадат является аналогом переходного состояния, образующегося при гидролитическом отщеплении фосфорильной группы, так как он способен принять бипирамидальную структуру, подобную той, какую дает фосфат (рис. 36.6).

36.5. Транспорт ионов и гидролиз АТФ тесно сопряжены

Важная характеристика насоса состоит в том, что *в отсутствие транспорта Na^+ и K^+ не происходит гидролиза АТФ*. Другими словами, система так сопряжена, что энергия АТФ не растрачивается впустую. Прочное сопряжение - общая особенность биологических систем, опосредующих превращение энергии. Вспомним, что и в митохондриях условием нормального потока электронов в дыхательной цепи служит одновременное генерирование АТФ (разд. 14.13). Другой пример сформулированного принципа - обязательное сопряжение гидролиза АТФ и мышечного сокращения.

Действие $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-насоса}$ можно обратить так, чтобы он приводил к синтезу АТФ. Суммарный синтез АТФ из АДФ и P_i

происходит в условиях резко увеличенных ионных градиентов. Это достигается инкубацией эритроцитов в среде с очень высокой (по сравнению с нормой) концентрацией Na^+ и очень низкой концентрацией K^+ .

36.6. Натрий-калиевый насос - олигомерный трансмембранный белок

$(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPаза}$ представляет собой тетрамер $\alpha_2\beta_2$ массой 270 кДа. Большая α -субъединица (95 кДа) содержит участок, осуществляющий гидролиз АТФ, и участок связывания кардиотонических стероидных ингибиторов. Меньшая β -субъединица (40 кДа) содержит углеводные группы. Между двумя α -субъединицами или между α - и β -субъединицами (но не между двумя β -субъединицами) легко образуются поперечные мостики. Исходя из этого факта, можно было предположить, что α -субъединицы контактируют друг с другом, тогда как β -субъединицы пространственно разделены. Как уже упоминалось, гидролиз АТФ протекает на той стороне мембраны, которая обращена к цитозолю, а участок связывания стероидных ингибиторов находится на наружной стороне мембраны. Следовательно, каждая α -субъединица пронизывает мембрану насквозь (рис. 36.7). Углеводные цепи β -субъединиц расположены на наружной стороне плазматической мембраны, как это вообще свойственно мембранным гликопротеинам (разд. 10.12).

Любопытно отметить, что рассматриваемый ферментный комплекс обладает одним участком связывания стероидных ингибиторов, одним участком фосфорилирования и тремя участками связывания Na^+ . Как

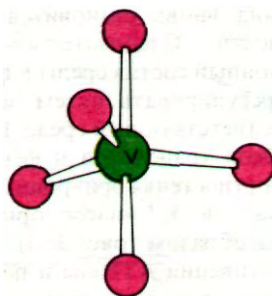


Рис. 36.6. Строение ванадат-иона (V^{5+}). Лиганды вокруг этого иона располагаются в виде двойной пирамиды, т.е. так же, как вокруг атома фосфора при гидролитическом отщеплении фосфорильной группы.

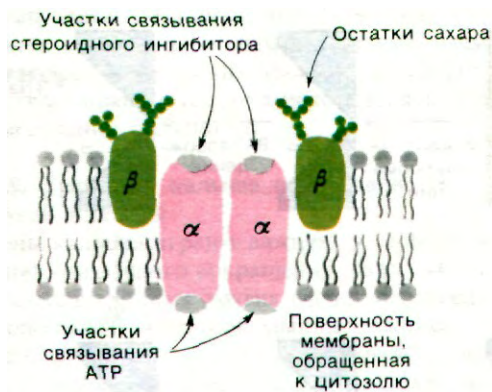


Рис. 36.7. Схематическое изображение субъединичной структуры и расположения в мембране $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -насоса.

же получается, что тетрамер с субъединичной структурой $\alpha_2\beta_2$ содержит *нечетное* число связывающих участков? Одна из возможностей состоит в том, что участки связывания расположены между субъединицами, в месте их контактов. Вспомним, что $\alpha_2\beta_2$ -тетрамер гемоглобина содержит единственный участок связывания бисфосфоглицерата, находящийся в полости, расположенной в центре молекулы (разд. 4.14). Однако существует и иная возможность, а именно такое взаимодействие двух $\alpha\beta$ -половин фермента, при котором связывание в одном из двух участков препятствует связыванию в другом. В самом деле, целый ряд олигомерных ферментов проявляет такую половинную реакционную способность.

36.7. Модель механизма действия натрий-калиевого насоса

Почему фосфорилирование и дефосфорилирование АТФазы приводят к переносу Na^+ и K^+ через мембрану? Структура этого насоса еще не настолько изучена, чтобы можно было детально описать механизм его действия. Все же полезно рассмотреть простую модель работы насоса, предложенную Олегом Ярдецким (Oleg Jardetzký). Согласно этой модели, структура белка, функционирующего в качестве насоса, должна отвечать трем условиям.

1. В белке должна быть полость такой величины, чтобы в ней умещались небольшая молекула или ион.
2. Белок должен существовать в двух конформациях, причем при одной из них по-

лость должна быть открыта со стороны, обращенной внутрь, а при другой - со стороны, обращенной наружу.

3. Указанные конформации должны иметь разное сродство к транспортируемым компонентам.

Рассмотрим эту модель применительно к транспорту Na^+ и K^+ (рис. 36.8). Две конформации белка - это формы E_1 и E_2 , уже описанные ранее. Постулировано, что 1) связывающая ионы полость на E_1 обращена внутрь клетки, а на E_2 - наружу и 2) E_1 обладает высоким сродством к Na^+ , а E_2 - к K^+ . Модель исходит также из двух установленных фактов, а именно 1) Na^+ запускает фосфорилирование, а K^+ - дефосфорилирование, 2) фосфорилирование стабилизирует форму E_2 , а дефосфорилирование - форму E_1 . На рис. 36.8 E_1 и E_2 изображены совершенно разными по конформации. Нужно, однако, подчеркнуть, что структурные различия между этими двумя формами вовсе необязательно должны быть большими. Сдвига нескольких атомов на расстояние 2 Å может оказаться достаточно, чтобы изменить ориентацию полости и сродство к Na^+ или K^+ . Существует множество прецедентов, позволяющих считать, что фосфорилирование способно вызвать изменения такого масштаба. Вспомним влияние фосфорилирования на свойства гликоген-фосфорилазы и гликоген-синтазы или на изменение сродства гемоглобина к кислороду при нековалентном связывании бисфосфоглицерата.

36.8. Кардиотонические стероиды - специфические ингибиторы $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -АТФазы и $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -насоса

Некоторые стероиды растительного происхождения являются мощными ингибиторами $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -АТФазы и насоса. Полумаксимальное ингибирование обоих процессов наблюдается при концентрации ингибитора порядка 10^{-8} М. Представители этого класса ингибиторов, в частности дигитоксигенин и убаин, называются *кардиотоническими стероидами* в связи с их выраженным действием на сердечную деятельность (рис. 36.9). Активность кардиотонических стероидов определяется наличием в их структуре 5- или 6-членного ненасыщенного лактонного кольца с β -конфигурацией при

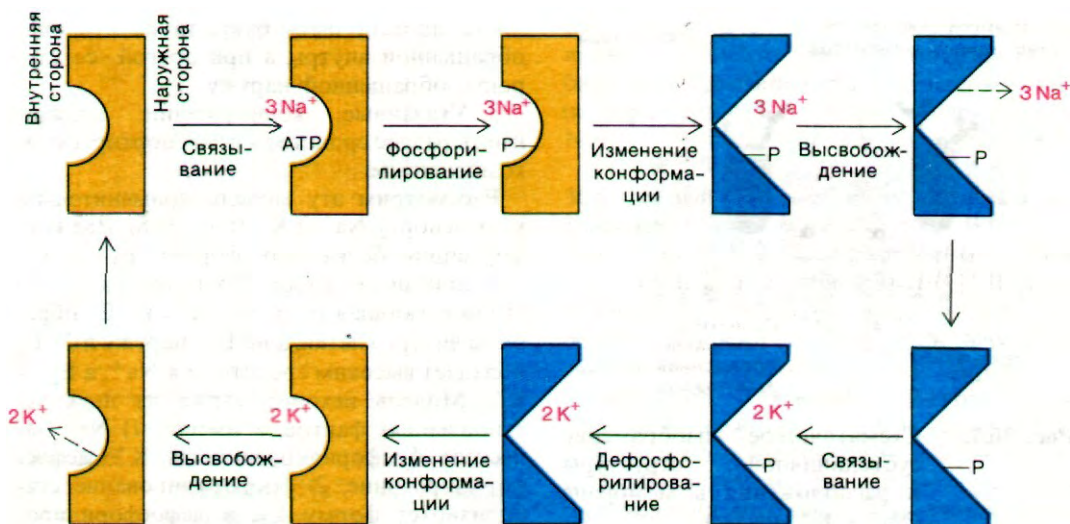
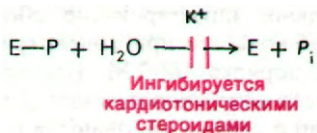


Рис. 36.8. Схематическое изображение предполагаемого механизма действия $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -насоса. На верхней половине рисунка последовательность реакций, направленных на выведение трех ионов Na^+ ; ниже — последовательность реакций, обеспечивающих вход двух ионов K^+ . Формы E_1 (желтый цвет) и E_2 (синий цвет) на рисунке сильно различаются по конформации. На самом деле конформационные различия могут быть очень небольшими.

С-17. Существенное значение имеют также гидроксильная группа при С-14 и *цис*-конфигурация сочленения колец С и D. В молекуле убаина и ряда других кардиотонических стероидов при С-3 находится остаток сахара, однако этот сахар не имеет значения для ингибирования АТФазы.



Как уже упоминалось, кардиотонические стероиды ингибируют реакцию дефосфорилирования $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -АТФазы. Ингибирование происходит только в том случае, если кардиотонические стероиды локализо-

ваны на *наружной* стороне мембраны. Таким образом, подавление дефосфорилирования этими стероидами пространственно так же асимметрично, как и активация дефосфорилирования ионами калия.

Кардиотонические стероиды, например *дигиталис*, имеют огромное значение в медицине. Дигиталис повышает силу сокращения сердечной мышцы и потому служит основным средством лечения острой сердечной недостаточности. Ингибирование дигиталисом $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -насоса приводит к повышению содержания Na^+ в клетках сердечной мышцы. Это сопровождается увеличением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , что в свою очередь повышает сократительную активность миокарда. Любопытно отметить, что дигиталис (алкалоид наперстянки) успешно использовался задолго до открытия $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -АТФазы. В 1785 г. врач и ботаник Уильям Уитеринг (William Withering) опубликовал «Описание наперстянки и некоторые способы ее применения в медицине», где рассказывает, каким образом он впервые узнал об использовании дигиталиса для лечения острой сердечной недостаточности.

«В 1775 г. меня спросили, каково мое мнение о домашнем способе лечения водянки. При этом сообщили, что этот способ был известен одной старухе в Шропшире и она долго держала его в секрете. Старуха иногда вылечивала больных, которым не могли помочь врачи... Ее снадобье состояло из 20 или более различных трав, однако разбирающемуся в этом предмете нетрудно было заметить, что активным началом могла быть только на-

перстянка... Наперстянка влияет на бие-
ние сердца в большей степени, чем
какое-либо из других лекарств, и это дей-
ствие можно с успехом использовать для
исцеления больного».

36.9. Транспорт кальция осуществляется другой АТРазой

Ионы кальция играют важную роль в регу-
ляции мышечного сокращения (разд. 34.10),
а также во многих других физиологических
процессах. В скелетной мышце содержится
сложная сеть связанных с мембраной трубоч-
ек и везикул. Эта мембранная система, на-
зываемая *саркоплазматическим ретикулу-
мом*, регулирует концентрацию Ca^{2+}
в среде, окружающей сократительные мы-
шечные волокна. В состоянии покоя Ca^{2+}
накапливается в саркоплазматический рети-
кулум, так что непосредственно вокруг мио-
фибрил концентрация Ca^{2+} бывает очень

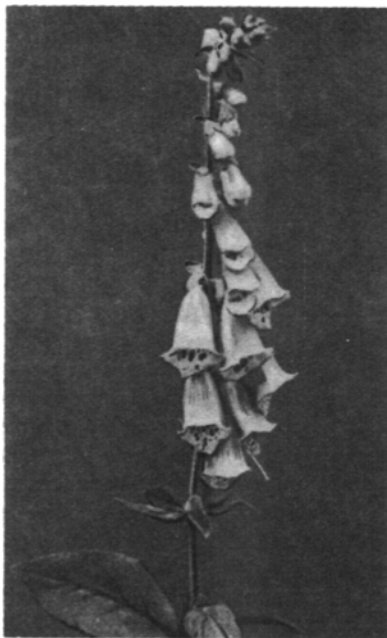
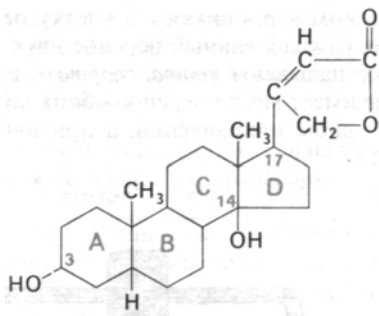
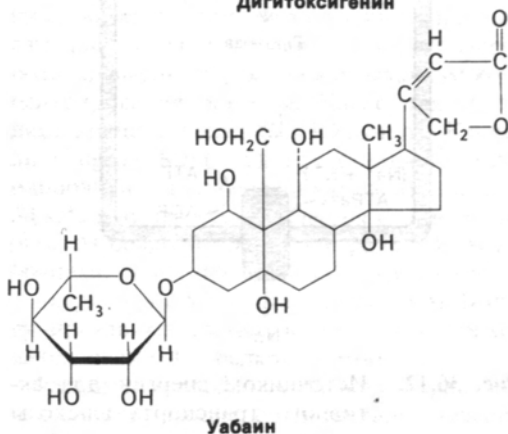


Рис. 36.10. Наперстянка. (Krochmal A.,
Krochmal C., A Guide to the
Medicinal Plants of the United
States, Quadrangle Books, 1973,
p. 243.)



Дигитоксигенин

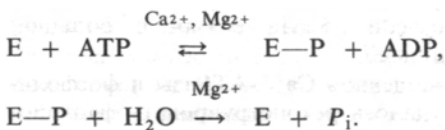


Уабаин

Рис. 36.9. Кардиотонические стероиды,
например дигитоксигенин и уа-
баин, ингибируют $(\text{Na}^+ +$
 $+ \text{K}^+)\text{-насос}$.

низкой. Возбуждение мембраны саркоплаз-
матического ретикулума под влиянием нер-
вного импульса ведет к мгновенному выс-
вобождению больших количеств Ca^{2+} , и это
запускает мышечное сокращение. Другими
словами, Ca^{2+} служит промежуточным
звеном между нервным импульсом и сокра-
щением мышечного волокна.

Транспорт Ca^{2+} через мембрану сарко-
плазматического ретикулума происходит за
счет энергии АТФ. В саркоплазматическом
ретикулуме имеется АТРаза, которую акти-
вирует Ca^{2+} . Эта Ca^{2+} -АТРаза является со-
ставной частью Ca^{2+} -насоса подобно тому,
как $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-АТРаза}$ - часть $(\text{Na}^+ +$
 $+ \text{K}^+)\text{-насоса}$. Ca^{2+} -АТРаза также подве-
гается фосфорилированию в ходе гидролиза
АТФ:



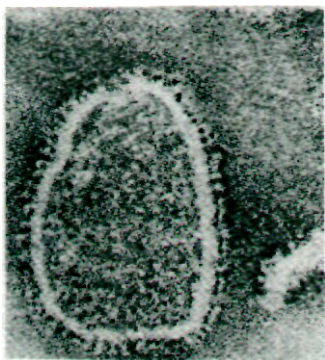


Рис. 36.11. Мембранные везикулы, образованные из очищенной Ca^{2+} -АТФазы. Глобулярные частицы на поверхности мембраны - участки молекулы АТФазы, пронизывающей мембрану. [Stewart P. S., MacLennan D. H., J. Biol. Chem., 249, 987 (1974).]

Цикл конформационных изменений, обусловленных фосфорилированием и дефосфорилированием, обеспечивает перенос двух ионов Ca^{2+} при расщеплении одной молекулы АТФ. Благодаря очень высокому сродству этой АТФазы к Ca^{2+} ($K \approx 10^{-7}$ М) фермент эффективно транспортирует Ca^{2+} из цитозоля (где $[\text{Ca}^{2+}] < 10^{-5}$ М) в саркоплазматический ретикулум (где $[\text{Ca}^{2+}] \approx 10^{-2}$ М).

Плотность молекул Ca^{2+} -насоса в мембране саркоплазматического ретикулума очень велика, а именно около 20 000 в расчете на 1 мкм^2 . В сущности, Ca^{2+} -АТФаза составляет более 80% общего количества интегральных белков мембраны и занимает треть ее поверхности. Большая субъединица (100 кДа) Са-насоса пронизывает мембрану и содержит участок фосфорилирования; как и в $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -насосе, таким участком является специфическая боковая цепь, представленная остатком аспартата. Еще одна общая черта обоих насосов - это наличие гликопротеина: в Ca^{2+} -насосе гликопротеин массой 55 кДа связан с большой субъединицей.

Из очищенной Ca^{2+} -АТФазы и фосфолипидов удалось реконструировать функционально активный Ca^{2+} -насос. В этом экспе-

рименте Ca^{2+} -АТФазу выделяли из мембран саркоплазматического ретикулума после их солюбилизации детергентом холатом. Очищенный солюбилизованный фермент добавляли к фосфолипидам из соевых бобов. После удаления детергента путем диализа образовывались мембранные везикулы. Эти *реконструированные везикулы с высокой скоростью накапливали Ca^{2+} в присутствии АТФ и Mg^{2+} .*

36.10. Поток Na^+ обеспечивает энергией активный транспорт сахаров и аминокислот в животных клетках

Многие транспортные процессы не зависят непосредственно от гидролиза АТФ, а сопряжены с потоком ионов по электрохимическому градиенту. Так, во многих животных клетках насыщение глюкозы обеспечивается одновременным входом Na^+ . При этом ионы натрия и глюкоза связываются со специфическим транспортным белком и проникают в клетку одновременно. Согласованный перенос двух компонентов называют *котранспортом*; при *симпорте* имеет место перенос обоих компонентов в одном направлении, а при *антипорте* - в

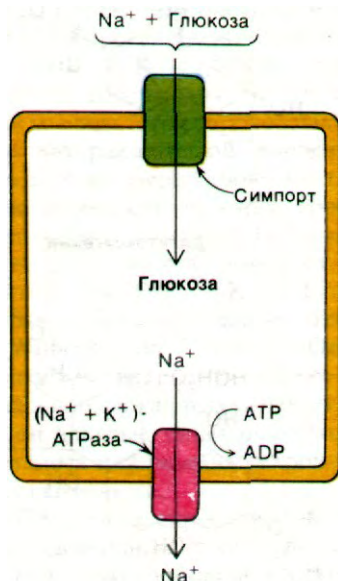


Рис. 36.12. Источником энергии для активного транспорта глюкозы служит градиент концентрации Na^+ . Эта система симпорта свойственна плазматическим мембранам клеток кишечника и почек.

противоположных направлениях. Ионы натрия, которые входят в клетку вместе с молекулами глюкозы посредством симпорта, выводятся из клетки ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-АТФазой (рис. 36.12). Количество транспортируемой глюкозы и скорость ее транспорта зависят от трансмембранного градиента концентрации Na^+ .

Зависящий от Na^+ симпорт широко используется в животных клетках для накопления аминокислот. В некоторых клетках, например в микроворсинках щеточной каемки кишечника (рис. 36.13), посредством симпорта осуществляется активный транспорт сахаров. Кроме того, в тонком кишечнике существует специализированный Na^+ -зависимый симпорт, обеспечивающий перенос ионов Cl^- против градиента концентрации. Во многих клетках ионы натрия служат также движущей силой в процессах антипорта, направленных на выведение ионов кальция. Таким образом, *градиент концентрации ионов натрия, создаваемый ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-АТФазой, обеспечивает энергией большинство симпортов и антипортов в животных клетках.*

36.11. Поток протонов служит движущей силой во многих процессах транспорта у бактерий

Симпорты и антипорты - эволюционно очень древние механизмы молекулярного транспорта. Так, движущей силой многих транспортных систем у бактерий служит поток протонов через плазматическую мембрану. Наиболее изученная бактериальная система симпорта - перенос лактозы у *E. coli* (рис. 36.14). У этой обитательницы нижних отделов кишечника млекопитающих выработался высокоэффективный механизм концентрирования лактозы. Насос для этого дисахарида, выделенный Юджином Кеннеди (Eugene Kennedy), представляет собой одиночную полипептидную цепь массой 30 кДа и называется *пермеазой для лактозы* (или М-белком). Это интегральный мембранный белок, который кодируется геном *u*, входящим в *lac*-оперон (разд. 28.3). В индуцированных клетках на его долю приходится около 4% белков мембраны.

Раскрытию механизма функционирования лактозного насоса способствовало изучение мутантов по гену *u*, а также исследования везикул (пузырьков), полученных из бактериальных мембран. Везикулы очень удобны для изучения процессов транспорта, поскольку они значительно проще устроены,

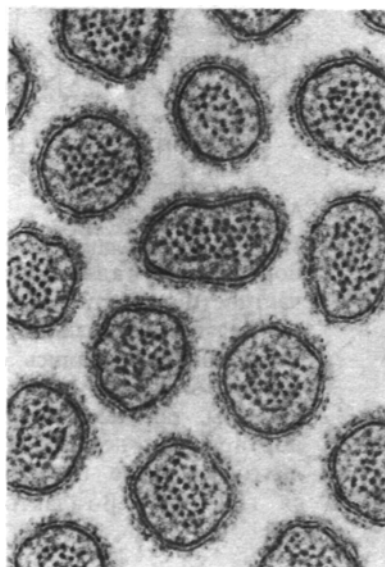


Рис. 36.13. Электронная микрофотография поперечного среза микроворсинок кишечника. Наличие микроворсинок во много раз увеличивает площадь поверхности, через которую происходит транспорт питательных веществ. (Печатается с любезного разрешения д-ра G. Pallade.)

чем целая бактерия. В везикулах есть система окислительного фосфорилирования и другие связанные с мембраной белки, но отсутствуют цитоплазматические компоненты интактной клетки. Сами по себе везикулы не накапливают лактозы, но если добавить субстрат окисления, обеспечивающий поток обладающих высоким потенциалом электронов по дыхательной цепи, то накопление лактозы имеет место. Этот же эффект можно получить и иным способом, а именно созданием градиента pH с помощью образуемой вне клеток кислоты. Создание мембранного потенциала градиентом концентрации K^+ также приводит к насасыванию лактозы. *Все эти данные показывают, что активный транспорт лактозы обеспечивается протонодвижущей силой в плазматической мембране.* Транспорт молекул лактозы сопряжен с движением протона в клетку. При физиологических условиях протонный

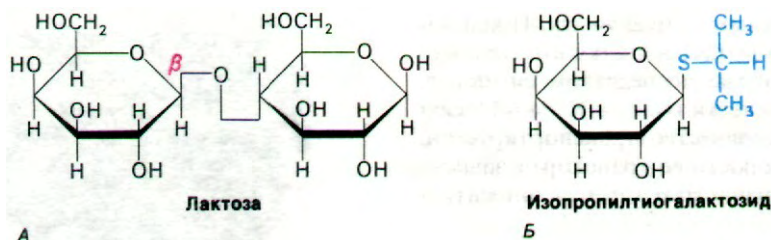


Рис. 36.14. Пермеаза для лактозы транспортирует β -галактозиды. в частности лактозу (А) и изопропилтиогактозид (Б). Тио-галактозиды оказались очень удобными для изучения этой системы, так как они транспортируются пермеазой для лактозы, но не подвергаются гидролизу β -галактозидазой.

градиент, необходимый для этого активного транспорта, возникает за счет потока электронов от донора, обладающего высоким потенциалом (например, NADH), по дыхательной цепи. *Симпорт протонов и лактозы* иллюстрирует обобщающую концепцию Питера Митчелла (Peter Mitchell) о «преобразовании энергии посредством протонного градиента» (разд. 14.18).

36.12. Активный транспорт ряда сахаров сопряжен с их фосфорилированием

Симпорт-не единственный тип насосов, осуществляющих транспорт сахаров. У некоторых бактерий накопление углеводов происходит путем сопряжения их входа в клетку с фосфорилированием. Например, у многих бактерий поступающая в клетки глюкоза превращается в глюкозо-6-фосфат. Особенность транспорта этого типа, называемого *транслокацией группы*, состоит в том, что в ходе транспорта происходит модификация растворенного вещества. Клеточная мембрана непроницаема по отноше-

нию к фосфорилированным сахарам, и потому они накапливаются внутри бактериальной клетки.

Наиболее хорошо изучен процесс транслкации групп, осуществляемый *фосфотрансферазной системой (ФТС)* которую открыл Сол Роузман (Saul Roseman). Особенность этой системы состоит в том, что *донором фосфорильной группы служит фосфоенолпируват*, а не АТФ или какой-либо иной нуклеозидтрифосфат. Суммарная реакция, катализируемая фосфотрансферазной системой, следующая:

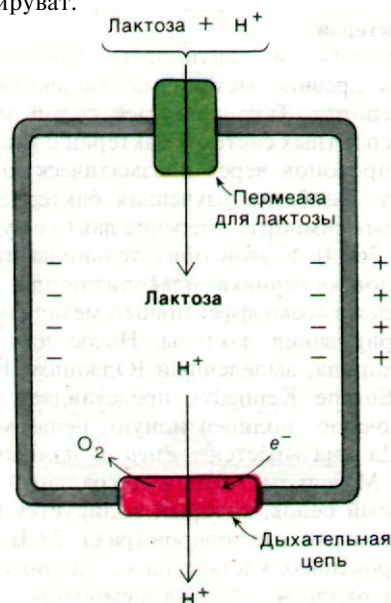
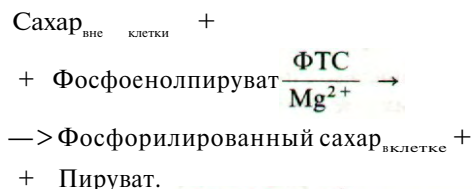
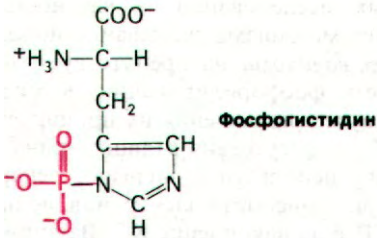


Рис. 36.15. Протонный градиент служит источником энергии для транспорта ряда сахаров и аминокислот в бактериальные клетки. Протонный градиент генерируется током электронов в дыхательной цепи.

Таблица 36.1. Углеводы, транспортируемые фосфотрансферазной системой *E. coli*

Глюкоза	Маннитол
Фруктоза	Сорбитол
Манноза	Галактитол
N-ацетилглюкозамин	Лактоза

В этой транслокации участвуют 4 белка: НРг, фермент I, фермент II и фермент III. Фермент II, будучи интегральным белком мембраны, образует трансмембранный канал и катализирует фосфорилирование сахара. При этом фосфорильная группа фосфоенолпирувата переносится на сахар не прямо, а сначала на фермент I и после на специфический остаток гистидина небольшого термостабильного белка НРг (рис. 36.16). Образующийся в качестве промежуточного соединения фосфогистидин имеет высокий потенциал переноса фосфатной группы. промежуточный по величине между соответствующими значениями для АТФ и фосфоенолпирувата. Далее происходит перенос фосфорильной группы от фосфорилированного НРг на фермент III - периферический мембранный белок, который уже взаимодействует с собственно каналом, т. е. ферментом II:



Конечный этап - перенос фосфорильной группы от фермента III на транспортируемый сахар (рис. 36.17). Из указанных четырех очищенных белков удалось реконструировать функционально активный ферментный комплекс.

Некоторые белки, входящие в состав фосфотрансферазной системы, обладают специфичностью, другие - нет. Так, НРг и фермент I, которые являются растворимыми белками цитозоля, участвуют в транспорте всех сахаров, переносимых этой системой. С другой стороны, ферменты II и III проявляют специфичность в отношении определенных сахаров. Например, в транспорте глюкозы, лактозы и фруктозы участвуют разные ферменты II и III. Такой же результат был получен и при генетических исследованиях. У мутантов, дефектных по НРг или ферменту I, не происходит транспорта большого числа разных сахаров, тогда как мутанты, дефектные по синтезу ферментов II и III, не способны транспортировать только какой-либо определенный сахар. Фермент III не участвует в транслокации гекситолов, в частности галактозола; в этом

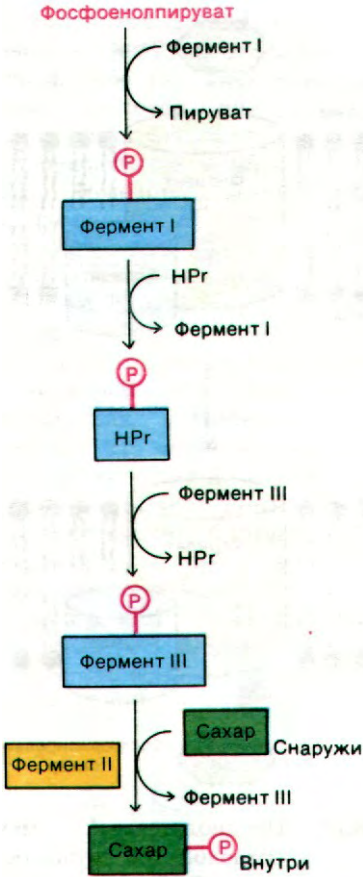


Рис. 36.16. Поток фосфорильных групп от фосфоенолпирувата на сахар, транспортируемый через мембрану фосфотрансферазной системой.

случае фосфорильная группа переносится непосредственно от НРг на углевод.

Чем объяснить, что фосфотрансферазная система устроена значительно сложнее других переносчиков, например пермеазы для лактозы? Представляется вероятным, что фосфотрансферазная система не только осуществляет транспорт сахаров, но и выполняет регуляторные функции. Избыточное поступление какого-то одного углевода под действием фосфотрансферазной системы сильно подавляет активный транспорт сахаров другими переносчиками. Это ингибирование опосредуется, по-видимому, изменением содержания сАМР, а именно повыше-

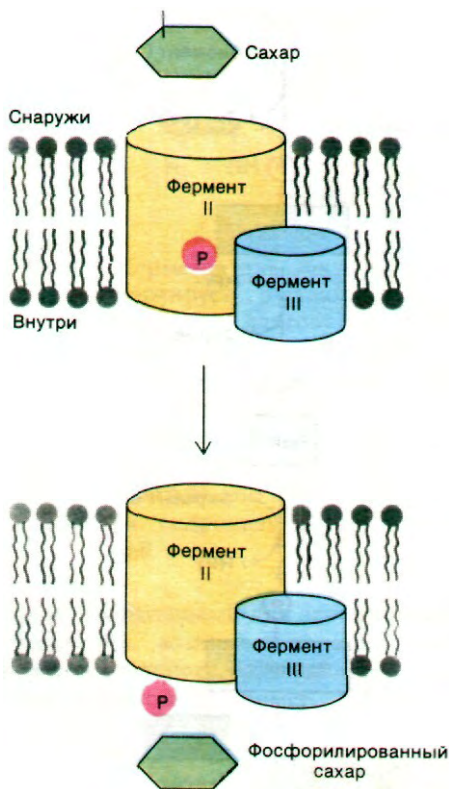


Рис. 36.17. Предполагаемый механизм транслокации групп, осуществляемой фосфотрансферазной системой.



Рис. 36.18. Транспортируемый фосфотрансферазной системой сахар α -метилглюкозид ингибирует образование cAMP.

ние концентрации сахара, накопленного фосфотрансферазной системой, ведет к снижению выработки cAMP (рис. 36.18). В результате прекращается транскрипция ряда индуцируемых оперонов. Вспомним, что экспрессия таких индуцируемых оперонов, как *lac* и *gal*, значительно возрастает при связывании комплекса cAMP с белком БАК в соответствующих участках промотора (разд. 28.6). Следовательно, *фосфотрансферазная система регулирует использование источников углерода*.

36.13. Транспортные антибиотики повышают ионную проницаемость мембран

Ряд микроорганизмов синтезирует низкомолекулярные соединения, в присутствии которых мембраны становятся проницаемыми для определенных ионов. Эти небольшие молекулы, называемые *транспортными антибиотиками*, оказались ценным инструментом для экспериментальных исследований, в частности для изучения механизма связывания ионов. Например, *валиномицин* препятствует окислительному фосфорилированию в митохондриях путем повышения их проницаемости для K^+ : в присутствии валиномицина митохондрии используют энергию, генерируемую при транспорте электронов, не на синтез АТФ, а на накопление K^+ . Валиномицин имеет циклическую структуру, образованную из повторяющейся три раза последовательности четырех разных остатков (А, В, В и Г) (рис. 36.19). Эти остатки четырех типов соединены чередующимися эфирными и пептидными связями.

Еще один хорошо изученный транспортный антибиотик - *грамисицин А* (рис. 36.20). Это полипептид с открытой цепью, состоящий из 15 аминокислотных остатков. Примечательна структура грамицидина А: в нем чередуются D- и L-аминокислоты. Кроме того, N- и C-концы полипептида модифицированы. Как будет показано несколько ниже, транспорт ионов грамицидином А и валиномицином осуществляется совершенно по-разному.

Механизм переноса ионов этими антибиотиками удобно исследовать на таких хорошо охарактеризованных модельных системах, как двуслойные липидные пузырьки (разд. 10.6) и плоские двуслойные мембраны (разд. 10.6). В опытах используют пузырьки, содержащие радиоактивный ион, например $^{42}K^+$; их получают путем обработки мембран ультразвуком в присутствии

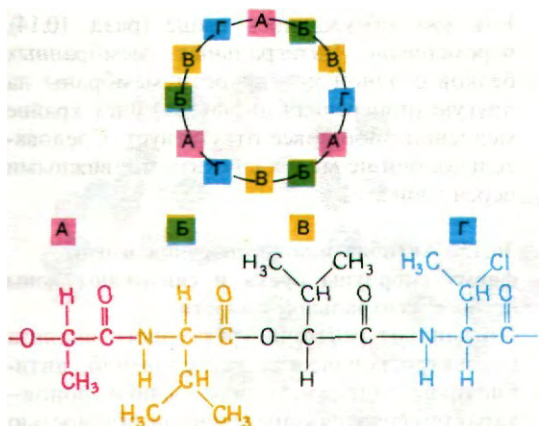


Рис. 36.19. Валиномицин имеет периодическую циклическую структуру, состоящую из остатков L-лактата (А), L-валина (Б), D-гидроксиизовалерианата (В) и D-валина (Г).

этого иона и последующего удаления $^{42}\text{K}^+$, не попавшего внутрь пузырьков, методом гель-фильтрации. Далее сравнивают скорость выхода радиоактивного иона из пузырьков в присутствии и в отсутствие антибиотика. Другой способ получения информации относительно ионной проницаемости двуслойных мембран состоит в измерении таких электрических параметров, как сопротивление мембраны и мембранный потенциал. Например, сопротивление двуслойной мембраны по отношению к K^+ в присутствии 10^{-7} М валиномицина или 10^{-9} М грамицидина падает более чем в 10000 раз при градиенте концентраций KCl на мембране 0,02 М.

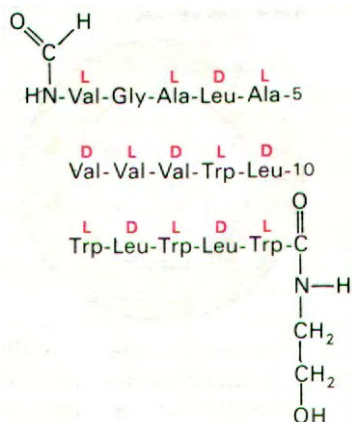


Рис. 36.20. Структура грамицидина А.

36.14. Транспортные антибиотики функционируют либо как подвижные переносчики, либо как каналообразователи
Существует два совершенно разных механизма действия транспортных антибиотиков на проницаемость мембран для ионов (рис. 36.21). Некоторые антибиотики (например, грамицидин А) формируют канал, пронизывающий мембрану. Ионы входят в такой канал на одной стороне мембраны, диффундируют по нему и выходят на другой стороне мембраны. Стимуляция транспорта ионов по этому механизму не сопряжена с движением самого антибиотика-каналообразователя. Антибиотики другой группы (например, валиномицин) функционируют как переносчики ионов через углеводородную область мембраны. Активность этих транспортных антибиотиков сопряжена с их собственной диффузией.

В эксперименте *подвижные переносчики* и *каналообразователи* можно различить следующим образом. Измеряют температурную зависимость ионной проводимости искусственной липидной двуслойной мем-

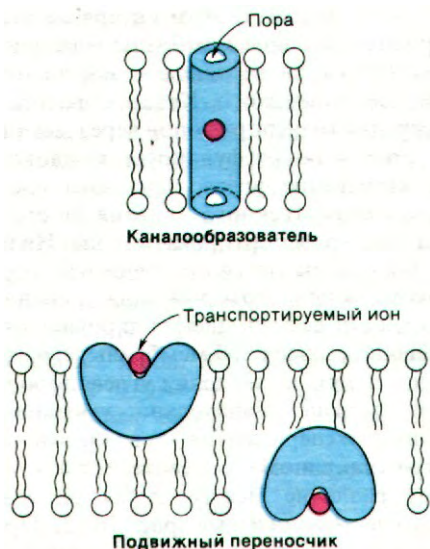


Рис. 36.21. Схематическое изображение различий между транспортными антибиотиками-каналообразователями и подвижными переносчиками. Все известные транспортные белки принадлежат к категории каналообразователей.



Рис. 36.22. Влияние температуры на проводимость липидных двухслойных мембран, одна из которых содержит транспортный антибиотик-каналообразователь, другая — транспортный антибиотик, являющийся подвижным переносчиком.

браны, содержащей транспортный антибиотик. При этом берут температурный интервал, включающий температуру фазового перехода липида; в этом интервале углеводородная середина мембраны переходит от практически затвердевшего состояния до совершенно жидкого. Каналообразователь, опосредуя транспорт ионов через мембрану, сам по себе не диффундирует. Следовательно, застывание углеводородного слоя не окажет существенного влияния на его способность транспортировать ионы. Иная ситуация складывается с подвижным переносчиком ионов, который для проявления активности должен диффундировать сквозь углеводородный слой мембраны: его эффективность при затвердении углеводородного слоя должна значительно уменьшиться. Данные экспериментов с валиномицином и грамицидином А действительно выявляют различие между двумя рассматриваемыми механизмами (рис. 36.22). Проницаемость содержащей валиномицин двухслойной мембраны возрастает при ее разжижении более чем в 1000 раз. В то же время на транспортную активность грамицидина А переход мембраны в жидкое состояние почти не оказывает влияния.

Важно подчеркнуть, что все известные в настоящее время природные системы транспорта представляют собой каналы.

Как уже обсуждалось выше (разд. 10.14), перемещение интегральных мембранных белков с одной поверхности мембраны на другую (поперечная диффузия) идет крайне медленно либо вовсе отсутствует. Следовательно, они не могут служить подвижными переносчиками.

36.15. Антибиотики-переносчики имеют форму скорлупы ореха и связывают ионы в своей центральной полости

По данным рентгеноструктурного анализа и спектроскопических исследований, антибиотики-подвижные переносчики ионов характеризуются определенной общностью структуры. Все исследованные к настоящему времени переносчики по форме напоминают скорлупу ореха. Единственный связываемый ион металла образует координационные связи с несколькими атомами кислорода, окружающими центральную полость. Число таких атомов кислорода (связывающих ион металла) обычно равно 6 или 8. Периферическая часть структуры подвижного переносчика состоит из углеводородных групп (рис. 36.23).

Функция центрально расположенных атомов кислорода, окруженных углеводородным наружным слоем, вполне очевидна. В самом деле, в водной среде ион металла, например K^+ , связывает через кислород несколько молекул воды. Антибиотик-переносчик конкурирует с молекулой воды за связывание иона, образуя с ним хелатное соединение через несколько соответствующим образом расположенных атомов кислорода в центральной полости. Благодаря углеводородной периферической части переносчи-



Рис. 36.23. Схематическое изображение хелатирования K^+ атомами кислорода в транспортном антибиотике-подвижном переносчике.

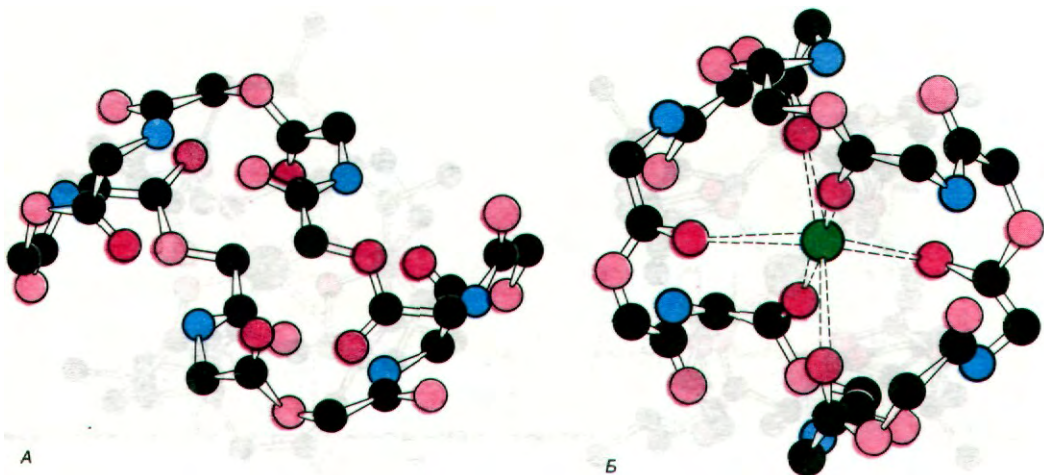


Рис. 36.24. Модели валиномицина (А) и его комплекса с K^+ (Б). При связывании K^+ происходит изменение конформации антибиотика. [Изображено в соответствии с атомными координатами, любезно предоставленными д-ром W. Duax (для валиномицина) и д-ром L. Steinrauf (для комплекса валиномицин— K^+).]

ка его комплекс с ионом растворим в липидах мембран. По существу, *каталитическое действие рассматриваемых антибиотиков на транспорт ионов через мембраны и состоит в том, что они переводят ионы в растворимую в липидах форму.*

На рис. 36.24 показаны структуры валиномицина и его комплекса с K^+ . Ион K^+ координирован с шестью атомами кислорода, описывающими октаэдр вокруг центральной полости молекулы. Эти атомы кислорода принадлежат карбонильным группам шести остатков валина в антибиотике. Метильные и изопропильные боковые цепи формируют углеводородную наружную часть молекулы валиномицина.

Интересна также структура комплекса с K^+ другого переносчика ионы антибиотика, а именно *нонактина* (рис. 36.25). В этом комплексе K^+ связан с восемью атомами кислорода в центре молекулы. Четыре атома кислорода из восьми принадлежат карбоксильным группам, а остальные четыре — эфирным связям.

36.16. Валиномицин связывает K^+ в 1000 раз прочнее, чем Na^+

Каким образом соединения, транспортирующие ионы, различают такие сходные ионы, как Na^+ и K^+ ? Валиномицин связывает K^+ в 1000 раз прочнее, чем Na^+ , т.е. избирательность этого переносчика выше, чем у $(Na^+ + K^+)$ -АТФазы. Рассмотрим основу столь высокой избирательности. Как показали спектроскопические исследования, комплексы валиномицина с Na^+ и K^+ очень сходны по структуре. В частности, в обоих комплексах одинаковы длины координационных связей между катионом в центре молекулы и атомами кислорода. Почему же тогда K^+ связывается намного прочнее, чем Na^+ ? Причина этой избирательности в том, что K^+ слабее, чем Na^+ , притягивает воду. Свободная энергия образования гидратной оболочки для Na^+ на 17 ккал/моль ниже, чем для K^+ (табл. 36.2). Следовательно, *валиномицин связывает K^+ прочнее потому, что отделение воды от K^+ требует мень-*

Таблица 36.2. Свойства щелочных катионов

Ион	Порядковый номер элемента	Радиус иона, А	Свободная энергия гидратации, ккал/моль
Li^+	3	0,60	-98
Na^+	11	0,95	-72
K^+	19	1,33	-55
Rb^+	37	1,48	-51
Cs^+	55	1,69	-47

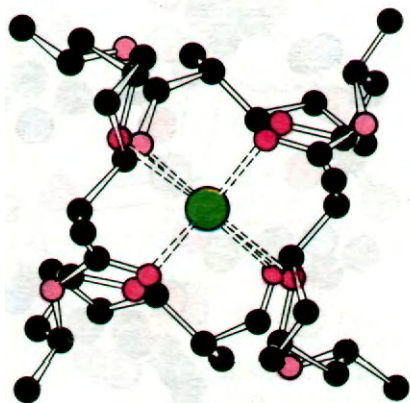
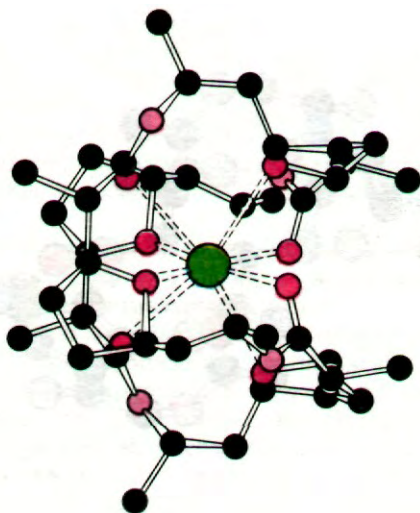


Рис. 36.25. Вид с двух сторон модели комплекса нонактина с K^+ .



шей затраты энергии, чем отделение Na^+ .

Пока еще не проводилось исследования атомарной структуры какого-либо ион-транспортного соединения, предпочтительно связывающего Na^+ , однако можно представить себе, каким должна быть ключевая особенность такой структуры. По-видимому, в ней должно отражаться использование того факта, что Na^+ имеет меньший ионный радиус ($r = 0,95 \text{ \AA}$), чем K^+ ($r = 1,33 \text{ \AA}$), благодаря чему отрицательно заряженные атомы кислорода могут в большей степени приблизиться к Na^+ , чем к K^+ ; таким путем может быть преодолен более высокий энергетический барьер дегидратирования Na^+ по сравнению с K^+ . Следовательно, можно предсказать, что участки специфического связывания Na^+ должны обладать высокой плотностью отрицательного заряда и такой геометрией, которая позволяла бы Na^+ плотно входить в них. В отличие от этого участки специфического связывания K^+ должны, по-видимому, обладать отрицательным зарядом меньшей плотности и их геометрия должна меньше подходить для образования очень коротких связей между катионом и координирующими группами.

Примечательна также гибкость молекулы валиномицина (рис. 36.24). Хелатирование

K^+ представляет собой ступенчатый процесс, в ходе которого молекулы воды гидратной оболочки иона последовательно вытесняются кислородными атомами антибиотика. Новые связи формируются по мере разрыва старых, и потому активационный барьер для связывания иона оказывается низким. Аналогичным образом и энергия активации противоположного процесса - высвобождения иона - также низка. В итоге валиномицин присоединяет и высвобождает K^+ множество раз на протяжении секунды. Важная роль гибкости структуры в этом случае так же очевидна, как и при действии ферментов.

36.17. Можно выявить поток ионов через единичный канал в мембране

Проводимость планарной двуслойной мембраны, содержащей небольшое количество грамицидина А, не является постоянной. Как показал Денис Хейдон (Denis Haydon), проводимость этой мембраны для Na^+ изменяется во времени ступенчато (рис. 36.26). Эти ступени проведения иона определяются спонтанным открыванием и закрыванием образованных грамицидином А каналов. Единичный канал остается открытым в течение примерно секунды. По такому каналу легко проходят одновалентные катионы, но неанионы и двувалентные катионы. Оказалось, что по одному каналу в течение секунды может, пройти более 10^7 ионов. Такая скорость транспорта только на один порядок величины ниже скорости диффузии в чистой воде. В отличие от этого максимальная скорость транспорта, осуществляемого подвижным переносчиком, составляет менее

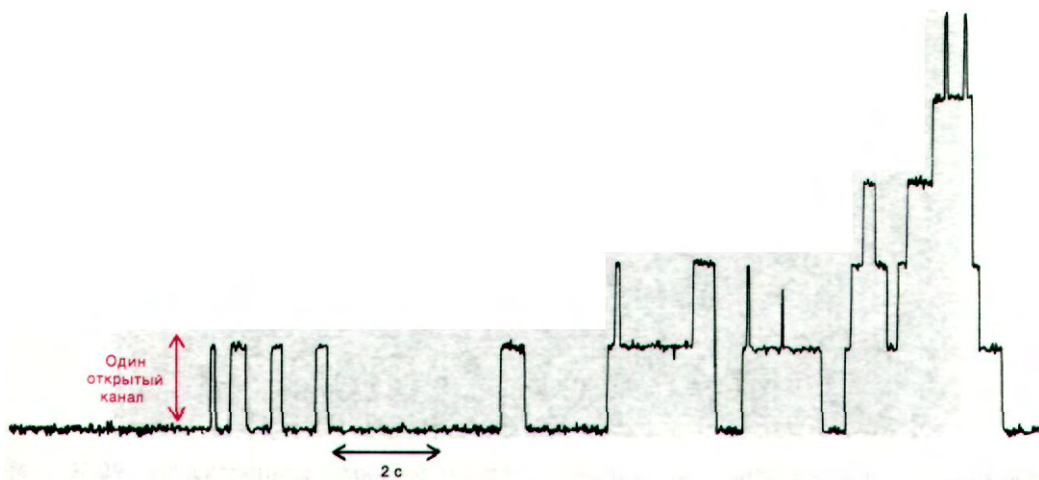


Рис. 36.26. Ступенчатое изменение проводимости липидной двуслойной мембраны, содержащей несколько молекул грамицидина А. Минимальное увеличение проводимости обусловлено появлением одного открытого канала. (Печатается с любезного разрешения д-ра О. Andersen.)

10^3 ионов в 1 с, так как повороты и перемещение подвижного переносчика в мембране занимают не менее 1 мс.

Методами спектроскопии и дифракции рентгеновских лучей было показано, что трансмембранный канал образуется из двух молекул грамицидина А (рис. 36.27). Внутри мембраны обладающий свойством проводника спирализованный димер находится в равновесии с непроводящими мономерами. По существу, ступенчатое изменение проводимости на рис. 36.26 соответствует процессу образования и диссоциации димеров. Димер формирует обводненный канал диаметром 4 А, окруженный полярными группами пептидов. Гидрофобные боковые цепи располагаются на периферии канала и контактируют с углеводородными цепями фосфолипидов мембраны. Окружающие водную пору карбоксильные группы в канале образуют кратковременные координационные связи с катионом в момент его прохождения по каналу. Как показал рентгеноструктурный анализ, связавший катионы канал становится короче и шире; это еще раз подчеркивает динамическую природу молекул, обладающих транспортной функцией.

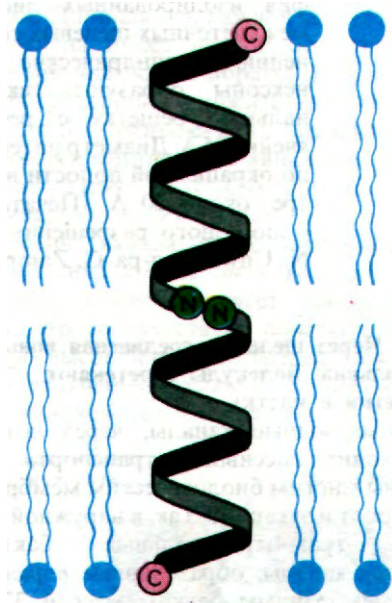


Рис. 36.27. Схематическое изображение канала из грамицидина А. Канал образуется путем связывания N-формильных концов двух полипептидов. Каждая цепь скручивается в β -спираль, похожую на свернутый в рулон β -складчатый слой. Изображенная модель была предложена Деном Ури (Dan Urry). [Weinstein S., Wallace B. A., Blout E. R., Morrow J. S., Veatch W., Proc. Nat. Acad. Sci., 76, 4230 (1979).]

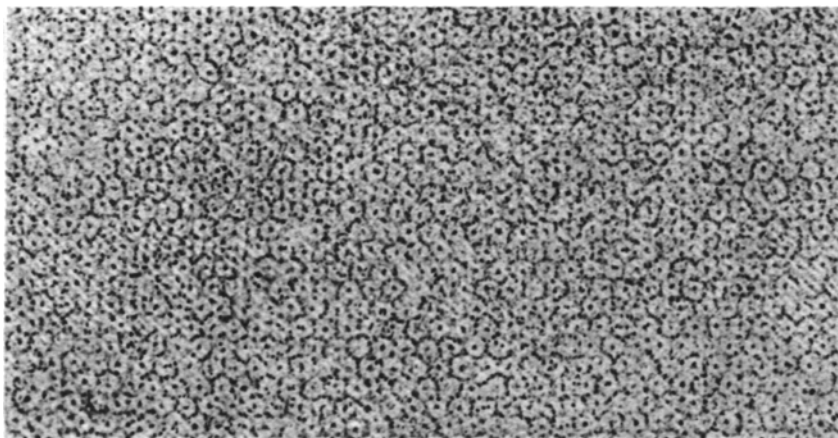


Рис. 36.28. Электронная микрофотография изолированных листов межклеточных щелевых соединений. Цилиндрические коннексоны образуют гексагональную решетку с ребром ячейки 85 Å. Диаметр интенсивно окрашенной полости в центре - около 20 Å. (Печатается с любезного разрешения д-ра N. Unwin и д-ра G. Zampighi.)

36.18. Через щелевые соединения ионы и небольшие молекулы перетекают из клетки в клетку

Большие водные каналы, через которые происходит пассивный транспорт, свойственны многим биологическим мембранам прокариот и эукариот. Так, в наружной мембране грам-отрицательных бактерий имеются каналы, образованные *поринами* — трансмембранным белком массой 37 кДа (разд. 32.14). По этим каналам диаметром 10 Å легко проникают в периплазматическое пространство полярные молекулы массой, не превышающей примерно 600 Да. Далее эти молекулы транспортируются в цитозоль посредством симпорта, транслокации групп или иных пермеаз. Подобным же образом в наружных мембранах митохондрий и хлоропластов имеются большие водные каналы, образованные из аналогичных порину молекул.

Наиболее хорошо изученным типом водного канала у эукариот является *щелевое соединение* (*щелевой контакт*), называемое

также *межклеточным каналом*, поскольку он служит протоком между внутренним содержимым многих смежных клеток. Щелевые соединения, открытые Жан-Полем Ревелем и Морисом Карновским (Jean-Paul Revel, Morris Karnovsky), располагаются скопом (кластерами) в определенных участках плазматических мембран прилежащих друг к другу клеток. На электронных микрофотографиях листов щелевых соединений (рис. 36.28) можно видеть, что каждое соединение образовано шестью субъединицами, окружающими пору диаметром 15-20 Å. На тангенциальном срезе (рис. 36.29) видно, что эти гексамеры пронизывают промежуток (щель) между соприкасающимися клетками (отсюда и название - щелевое соединение). Для определения внутреннего размера щелевых соединений производили микроинъекцию ряда флуоресцирующих веществ в одни клетки и затем наблюдали, как распространяется флуоресценция по соседним клеткам. По данным Вернера Лёвенштейна (Werner Loewenstein), все полярные вещества массой до 1 кДа легко проходят по межклеточным каналам. Другими словами, *по щелевым соединениям из одной клетки в другую могут поступать неорганические ионы и большинство метаболитов (сахара, аминокислоты, нуклеотиды)*. Что касается белков, нуклеиновых кислот и полисахаридов, то из-за своих больших размеров они не проходят по этим каналам.

Щелевые соединения играют важную роль в межклеточной коммуникации. В ряде возбудимых тканей, например в сердечной мышце, клетки объединены в единую систему быстрым потоком ионов через эти соединения; таким путем достигается быстрый и синхронный ответ на стимуляцию. Через



Рис. 36.29. Электронная микрофотография тангенциального среза щелевых соединений между прилежащими клеточными мембранами. [Hertzberg E. L., Gilula N. B., J. Biol. Chem., 254. 2143 (1979).]

щелевые контакты происходит также питание клеток, удаленных от кровеносных сосудов, например в костях или хрусталике глаза. Представляется вероятным, что рассматриваемые каналы коммуникации имеют важное значение в регуляции процессов развития и дифференцировки.

Проницаемость щелевых контактов регулируется ионами кальция. *Повышение внутриклеточного содержания Ca^{2+} приводит к тому, что щелевой контакт в той или иной мере закрывается.* Межклеточные каналы полностью открыты при концентрации Ca^{2+} ниже 10^{-7} М и полностью закрываются при концентрации Ca^{2+} , превышающей $5 \cdot 10^{-5}$ М. Увеличение содержания Ca^{2+} в указанном диапазоне приводит к сужению просвета межклеточных каналов, причем в первую очередь снижается проницаемость для более крупных молекул. Структурная основа таких изменений просвета каналов была выявлена при анализе реконструированных трехмерных изображений полей щелевых контактов, взятых в двух различающихся по четвертичной структуре состояниях. Эти структурные исследования показали, что щелевой контакт состоит из двух смыкающихся цилиндрических единиц, названных *коннексами*. Каждый коннексон образован шестью субъединицами, имеет длину 75 А и насквозь пронизывает плазматическую мембрану. Сегмент коннекса длиной 20 А вы-

ступает во внеклеточное пространство и соединяется с коннексоном прилежащей клетки. Длинная ось каждой из субъединиц коннекса имеет наклон по отношению к поперечной оси мембраны. Путем скольжения субъединиц относительно друг друга происходит уменьшение их наклона к поперечной оси мембраны, и канал при этом закрывается (рис. 36.31). Самые большие конформационные изменения имеют место в середине канала, где субъединицы двух стыкующихся коннексонов скользят относительно друг друга на расстояние примерно 11 А, что соответствует повороту на 28° . Анализ высокой степени разрешения позволит в дальнейшем выявить, каким образом Ca^{2+} индуцирует скольжение и поворот.

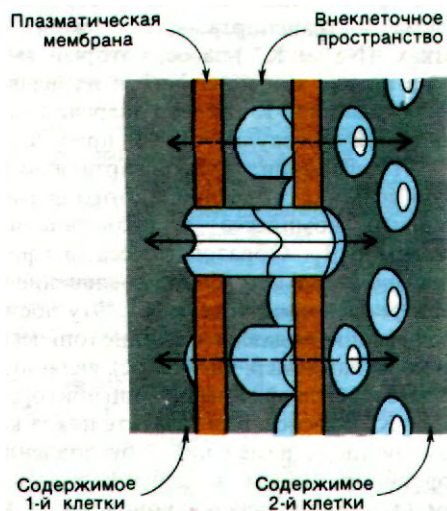


Рис. 36.30. Схематическое изображение щелевого контакта.

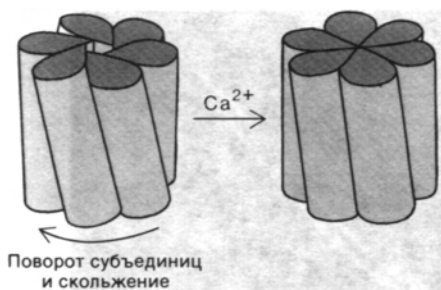


Рис. 36.31. Модель регуляции ионами Ca^{2+} степени закрывания щелевого соединения. (По рисунку, любезно предоставленному д-ром N. Unwin и д-ром G. Zampighi.)

Закключение

Транспорт молекул и ионов через биологические мембраны осуществляется трансмембранно ориентированными белками, которые формируют каналы. Транспорт является пассивным, если ΔG для транспортируемого компонента отрицательно; в случае активного транспорта величина ΔG положительна. Изменения свободной энергии зависят от соотношения концентраций транспортируемого компонента по двум сторонам мембраны и от мембранного потенциала, если мембрана заряжена. Активный транспорт требует вклада свободной энергии. Наиболее распространенная система транспорта в животных клетках - $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -насос, который выводит из клетки три иона Na^+ и насасывает в клетку два иона K^+ за счет энергии гидролиза одной молекулы АТФ. В присутствии Na^+ АТФ фосфорилирует аспартатную боковую цепь в α -субъединице этого ферментативного комплекса с субъединичным составом $\alpha_2\beta_2$. Образовавшееся фосфорилированное промежуточное соединение гидролизуется в присутствии K^+ . Эту последнюю реакцию подавляют кардиотонические стероиды (например, дигиталис), являющиеся высокоспецифичными ингибиторами $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -насоса. В результате цикла конформационных изменений, обусловленных фосфорилированием и дефосфорилированием, происходит перенос ионов Na^+ и K^+ . Транспорт ионов кальция, играющих важную роль в регуляции мышечного сокраще-

ния, осуществляется иной АТРазной системой, локализованной в мембране саркоплазматического ретикулума. Однако и в этом случае процесс транспорта сопряжен с фосфорилированием остатка аспартата. Обе системы транспорта - как Ca^{2+} , так и $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ - удалось реконструировать из соответствующих очищенных АТРаз и фосфолипидов.

Для ряда транспортных систем непосредственным источником энергии служит не гидролиз АТФ, а градиент концентрации ионов. Так, активный транспорт глюкозы и аминокислот в ряде животных клеток сопряжен с одновременным входом Na^+ ; такой процесс называется котранспортом. Одновременный вход Na^+ и глюкозы обеспечивается специфическим симпортом. $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -насос создает тот градиент концентрации ионов Na^+ , который необходим для сопряженного входа Na^+ и глюкозы. У бактерий, как правило, непосредственным источником энергии для симпортов и антипортов служит градиент концентрации H^+ , а не Na^+ . Например, активный транспорт лактозы, осуществляемый пермеазой для лактозы, сопряжен с входом протона в бактериальную клетку. Этот транспортный процесс протекает за счет протонодвижущей силы, генерируемой переносом электронов по дыхательной цепи. Бактериям свойствен и иной тип транспорта, а именно так называемая транслокация групп; в этом случае происходит модификация растворенного вещества в процессе переноса. Так, фосфотрансферазная система, переносящая сахара, фосфорилирует их (например, глюкозу в глюкозо-6-фосфат) по мере поступления в клетку. Донором фосфорильной группы в этом процессе служит фосфоенолпируват. Фосфорилирование опосредовано тремя разными ферментами и небольшим белком (NPr) - переносчиком фосфорильной группы.

Клетки прокариот и эукариот содержат также наполненные водой каналы, по которым ионы и небольшие полярные молекулы могут пассивно диффундировать сквозь мембраны. Например, в наружных мембранах грам-отрицательных бактерий имеются пориновые каналы диаметром около 10 А. Между соприкасающимися клетками высших организмов во многих случаях имеются щелевые соединения. По этим каналам диаметром 20 А ионы и большинство метаболитов (например, моносахариды, аминокислоты и нуклеотиды) могут

перетекать из одной клетки в другую. Щелевые соединения закрываются под действием Ca^{2+} . Эти протоки между соприкасающимися клетками играют важную роль в межклеточной коммуникации.

Транспортные антибиотики повышают проницаемость мембран для определенных ионов, функционируя в качестве подвижных переносчиков (например, валиномицин) либо каналообразователей (например, грами-

цидин А). Молекула антибиотика подвижного переносчика, имеющая форму скорлупы ореха, связывает в центральной полости один ион металла. Благодаря углеводородной периферической части весь комплекс способен проходить сквозь внутренний углеводородный слой мембраны. Каналообразующие антибиотики формируют пронизывающие мембрану водные поры.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

Hobbs A.S., Alberts R.W., 1980. The structure of proteins involved in active membrane transport, *Ann. Rev. Biophys.*, 9, 259-291.

Wilson D.B., 1978. Cellular transport mechanisms, *Ann. Rev. Biochem.*, 47, 933-965.

Harold F.M., 1978. Vectorial metabolism. In: *Ornston L.N. and Sokatch J.R. (eds.)*, *The Bacteria*, vol. 6, pp. 463-521, Academic Press.

Saier M.H., Jr., 1979. The role of the cell surface in regulating the internal environment. In: *Sokatch J.R. Ornston L.N. (eds.)*, *The Bacteria*, vol. 7, pp. 167-227, Academic Press.

Estes J.W., White P.D., 1965. William Withering and the purple foxglove, *Sci. Amer.*, 212(6), 110-117. (Любопытное описание истории открытия и использования дигиталиса.)

Книги

Andreoli T.E., Hoffman J.F., Fanestil D.D. (eds.), 1978. *Physiology of Membrane Disorders*, Plenum. (Содержит прекрасные статьи, касающиеся многих аспектов мембранного транспорта.)

Rosen B.P. (ed.), 1978. *Bacterial Transport*, Dekker.

Транспорт ионов Na^+ и K^+

Skou J.C., Norby J.G. (eds.), 1979. *Na, K-ATPase: Structure and Kinetics*, Academic Press.

Fishman M.C., 1979. Endogenous digitalis-like activity in mammalian brain, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 76, 4661-4663.

Sweadner K.J., Goldin S.M., 1980. Active transport of sodium and potassium ions: mechanism, function, and regulation, *New Engl. J. Med.*, 302, 777-783.

Cantley L.C., Jr., Resh M.D., Guidotti G., 1978. Vanadate inhibits the red cell (Na^+ , K^+)-ATPase from the cytoplasmic side, *Nature*, 272, 552-554.

Akera T., 1977. Membrane adenosinetriphosphatase: a digitalis receptor? *Science*, 198, 569-574. (Обзор данных, показывающих, что (Na^+ + K^+)-АТФазы является мишенью фармакологического действия дигиталиса.)

Jardetzky O., 1966. Simple allosteric model for membrane pumps, *Nature*, 211, 969.

Транспорт ионов кальция

DeMeis L., Vianna A.L., 1979. Energy interconversion by the Ca^{2+} -dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum, *Ann. Rev. Biochem.*, 48, 275-292.

MacLennan D.H., Campbell K.P., 1979. Structure, function, and biosynthesis of sarcoplasmic reticulum proteins, *Trends Biochem. Sci.*, 4, 148-151.

Tada M., Yamamoto T., Tonomura Y., 1978. Molecular mechanism of active calcium transport by sarcoplasmic reticulum, *Physiol. Rev.*, 58, 1-79.

Racker E., 1972. Reconstitution of a calcium pump with phospholipids and a purified Ca^{2+} -adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum, *J. Biol. Chem.*, 247, 8198-8200.

Wasserman R.H., Fullmer C.S., Taylor A.N., 1978. The vitamin D-dependent calcium binding proteins. In: *Lawson D. E. M. (ed.)*, *Vitamin D*, Academic Press.

Kretsinger R.H., 1976. Calcium-binding proteins, *Ann. Rev. Biochem.*, 45, 239-266.

Система транспорта у бактерий

Kaback H.R., Ramos S., Robertson D.E., Stroobant P., Tokuda H., 1977. Energetics and molecular biology of active transport in bacterial membrane vesicles, *J. Supramol. Struct.*, 7, 443-461.

Saier M.H., Jr., 1977. Bacterial phosphoenolpyruvate sugar phosphotransferase systems: structural, functional, and evolutionary interrelationships, *Bacteriol. Rev.*, 41, 856-871.

Simoni R.D., Postma P.W., 1975. The energetics of bacterial active transport, *Ann. Rev. Biochem.*, 44, 523-554.

Каналы между клетками

Loewenstein W.R., Kanno Y., Socolar S.J., 1978. The cell-to-cell channel, *Fed. Proc.*, 37, 2645-2650.

Unwin P.N.T., Zampighi G., 1980. Structure of the junction between communicating cells, *Nature*, 283, 545-549.

Hertzberg E.L., Gilula N.B., 1979. Isolation and characterization of gap junctions from rat liver, *J. Biol. Chem.*, 254, 2138-2147.

Staehelin L.A., Hull B.E., 1978. Junctions between living cells, *Sci. Amer.*, 238(5), 140-152.

Транспортные антибиотики

Urban B.W., Hladky S.B., Haydon D.A., 1978. The kinetics of ion movements in the gramicidin channel, *Fed. Proc.*, 37, 2628-2632.

Ovchinnikov Y.A., 1979. Physico-chemical basis of ion transport through biological membranes: ionophores and ion channels, *Eur. J. Biochem.*, 94, 321-336.

Lauger P., 1972. Carrier-mediated ion transport, *Science*, 178, 24-30.

Krasne S., Eisenman G., Szabo G., 1971. Freezing and melting of lipid bilayers and the mode of action of nonactin, valinomycin, and gramicidin, *Science*, 174, 412-415.

Koepe R.E., Berg J.M., Hodgson K.O., Stryer L., 1979. Gramicidin A crystals contain two cation binding sites per channel, *Nature*, 279, 723-725.

ГЛАВА 37

Возбудимые мембраны и сенсорные системы

Мембраны многих клеток способны возбуждаться под действием специфических химических или физических стимулов. Ответы мембраны аксона нервной клетки на электрический стимул, синапса на выделение медиатора, палочек сетчатки на свет, подвижных клеток на молекулы аттрактантов - все это реакции, опосредованные возбудимыми комплексами, присутствующими в мембранах. Эти и другие процессы, опосредованные возбудимыми комплексами, имеют следующие общие особенности.

1. Стимул воспринимается высокоспецифичным белком-рецептором, который является *интегральным компонентом возбудимой мембраны*.

2. Специфический стимул вызывает *изменение конформации* рецептора, что в свою очередь приводит к изменению проницаемости мембраны или активности связанного с мембраной фермента. При этом во многих случаях происходит *многократное усиление* ответа на специфические стимулы.

3. Как конформационный сдвиг, так и возникающие в результате функциональные изменения рецептора *обратимы*. Существуют специальные механизмы, возвращающие рецептор в состояние покоя и восстанавливающие его возбудимость.

В этой главе мы рассмотрим четыре типа возбудимых комплексов, начав с натриевого канала в мембранах аксонов нервных клеток; этот зависимый от потенциала канал участвует в возникновении потенциала действия в нервах. Далее мы обратимся к химически регулируемому каналу и рассмотрим,

как рецепторы ацетилхолина обеспечивают проведение нервного импульса в определенных синапсах. Затем перейдем к палочкам сетчатки глаза - исключительно чувствительному детектору света. При этом мы познакомимся с ролью фоторецепторного белка родопсина в преобразовании света в нервный сигнал. Последняя тема данной главы - хемотаксис, т. е. движение клеток по направлению к веществам-аттрактантам и от веществ-репеллентов. В последние годы получено много новых сведений относительно сопряжения хеморецепторов с двигательным аппаратом у бактерий.

37.1. Потенциалы действия опосредованы кратковременными изменениями проницаемости для Na^+ и K^+

Нервные импульсы представляют собой электрические сигналы, создаваемые током ионов через плазматическую мембрану нейронов. В нейроне, как и в большинстве клеток, K^+ содержится в высокой концентрации, а Na^+ - в низкой. Градиенты концентрации этих ионов генерируются ($\text{Na}^+ +$

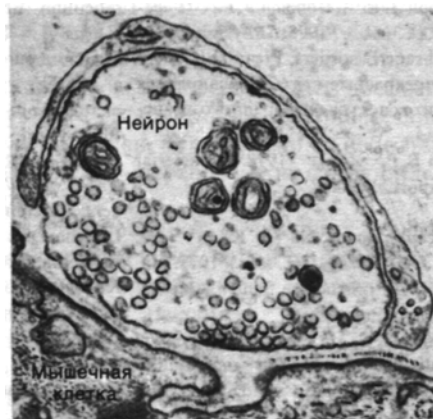


Рис. 37.1. Электронная микрофотография синапса. (Печатается с любезного разрешения д-ра U. Jack McMahan.)

+ K^+)-насосом (разд. 36.2). В состоянии покоя проницаемость мембраны нервной клетки для K^+ гораздо выше, чем проницаемость для Na^+ , и поэтому мембранный потенциал определяется главным образом отношением внутриклеточной концентрации K^+ к внеклеточной (рис. 37.2, А). В нестимулированных аксонах мембранный потенциал составляет -60 мВ; это близко к величине -75 мВ (равновесный K^+ -потенциал), которая соответствует проницаемости мембраны для одних только ионов K^+ . Нервный импульс, или *потенциал действия*, возникает при деполяризации мембраны, выходящей за пределы выше порогового уровня (а именно с -60 до -40 мВ). За несколько миллисекунд мембранный потенциал становится положительным и достигает примерно $+30$ мВ, после чего вновь делается отрицательным. Эта усиленная в несколько раз деполяризация распространяется по нерву, достигая нервного окончания. Враскрытии природы потенциала действия важную роль сыграло изучение гигантского аксона кальмара. Поскольку в этот необычайно крупный аксон (диаметром около миллиметра) нетрудно ввести электроды, он стал излюбленным объектом исследователей.

Каков механизм возникновения потенциала действия? Ален Ходжкин и Эндрю Хаксли (Alan Hodgkin, Andrew Huxley) провели остроумные исследования, показавшие, что *потенциал действия возникает в результате сильных кратковременных изменений проницаемости мембраны аксона для ионов Na^+ и K^+* (рис. 37.2, Б). Сначала меняется проницаемость мембраны для Na^+ . Деполяризация мембраны выше порогового уровня приводит к открытию Na^+ -каналов. В силу существования высокого трансмембранного электрохимического градиента концентрации Na^+ ионы натрия начинают входить в клетку. Вход Na^+ усиливает деполяризацию мембраны и способствует тому, что открывается еще большее число Na^+ -каналов. Эта положительная обратная связь между деполяризацией и входом Na^+ приводит к очень быстрым и очень большим по величине изменениям мембранного потенциала: от -60 до $+30$ мВ за одну миллисекунду. Вход прекращается при достижении примерно $+30$ мВ, так как это значение соответствует равновесному Na^+ -потенциалу. Другими словами, по достижении этого потенциала исчезает та термодинамическая

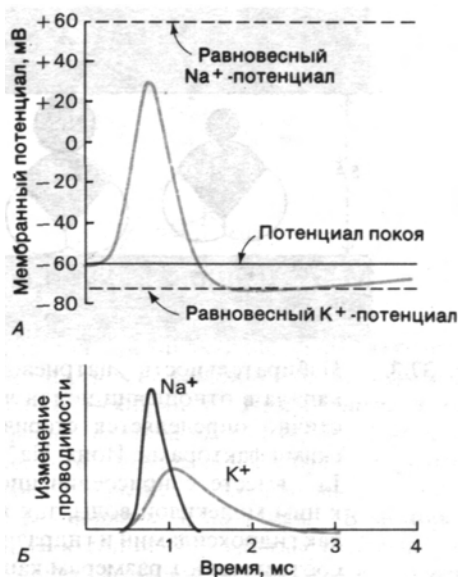


Рис. 37.2. Потенциал действия возникает в результате деполяризации мембраны аксона нервной клетки. Показано изменение во времени мембранного потенциала (А) и проводимости ионов натрия и калия (Б).

движущая сила, за счет которой происходил вход Na^+ . Na^+ -каналы спонтанно закрываются, и к этому времени начинают открываться K^+ -каналы (рис. 37.2, Б). В результате ионы калия входят в клетку, и мембранный потенциал вновь становится отрицательным. Примерно через две миллисекунды мембранный потенциал становится равным -75 мВ, т. е. равновесному K^+ -потенциалу. Уровень покоя -60 мВ восстанавливается еще через несколько миллисекунд, когда проводимость K^+ снижается до величины, характеризующей нестимулированное состояние. Необходимо подчеркнуть, что во время потенциала действия через плазматическую мембрану проходит очень малое количество ионов Na^+ и K^+ - примерно одна миллионная часть от содержания этих ионов в нервной клетке. Другими словами, при одном нервном импульсе расходуется лишь ничтожно малая часть (Na^+ - K^+)-градиента. Из этого явствует, насколько эффективен потенциал

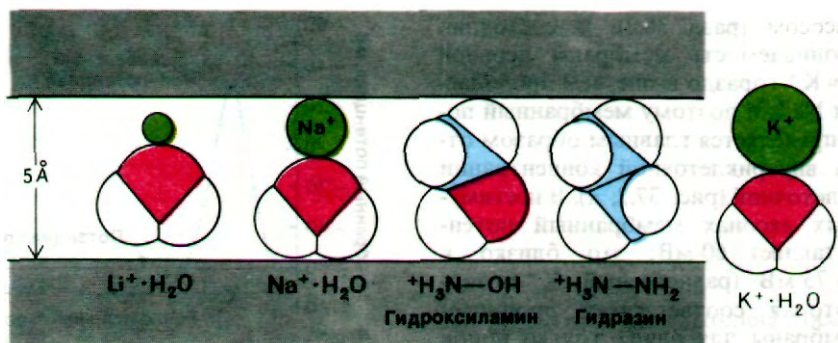


Рис. 37.3. Избирательность натриевого канала в отношении ионов частично определяется стерическими факторами. Ионы Na^+ и Li^+ вместе с присоединенной к ним молекулой воды, так же как гидроксилламин и гидразин, соответствуют размерам канала. В отличие от этого K^+ с присоединенной молекулой воды оказывается слишком большим для канала. (Keynes R. D., Ion-channels in the nerve-cell membrane, Scientific American, Inc., 1979.)

сильной группы гидроксилламина не образует водородной связи с кислородным атомом канала. В результате метиламин не проходит по каналу. Обнаружен еще один важный факт: проводимость Na^+ -канала в отношении всех проникающих катионов значительно уменьшается при снижении pH. По существу, относительная проницаемость соответствует кривой титрования кислоты с рК 5,2, что указывает на присутствие отрицательно заряженного карбоксилат-иона в активной форме канала. Таким образом, избирательность Na^+ -канала в отношении Na^+ обусловлена наличием отрицательно заряженного участка с малым радиусом. Ион K^+ , будучи крупнее, чем Na^+ , практически не может пройти через эту область (рис. 37.3).

действия как средство сигнализации на большие расстояния.

Na^+ -канал проводит Na^+ в 11 раз лучше, чем K^+ . Как достигается такая избирательность? Окончательный ответ на этот вопрос будет получен только после анализа структуры канала при высоком разрешении. Однако электрофизиологические исследования относительной проницаемости канала для различных щелочных катионов и органических катионов все же дают определенный ключ к решению данного вопроса. Зависимость проницаемости от размера иона (табл. 37.1) указывает на то, что канал узок: через него не проходят ионы, диаметр которых превышает 5 Å. Однако проводимость определяется не только размерами. Так, метиламин (H_3CNH_3^+) имеет почти такие же размеры, как гидразин (H_2NNH_3^+) и гидроксилламин (HONH_3^+), но при этом несравненно хуже проходит через канал. Причина, по всей вероятности, кроется в том, что метильная группа метиламина в отличие от аминогруппы гидразина или гидрок-

37.2. Тетродотоксин и сакситоксин блокируют натриевые каналы в мембранах аксонов нервных клеток

Тетродотоксин - сильнодействующий яд рыбы иглобрюха - блокирует проведение нервных импульсов вдоль аксона и в возбудимых мембранах нервных волокон, что вызывает паралич дыхания. Летальная доза для мыши составляет около 0,01 мкг. В свя-

Таблица 37.1. Относительная проницаемость натриевого и калиевого каналов в мембранах аксонов

Ион	Na^+ -канал	K^+ -канал
Li^+	0,93	<0,01
Na^+	1,00	<0,01
K^+	0,09	1,00
Rb^+	<0,01	0,91
Cs^+	<0,01	<0,08
NH_4^+	0,16	0,13
HONH_3^+	0,94	<0,03
H_2NNH_3^+	0,59	<0,03
H_3CNH_3^+	<0,01	<0,02

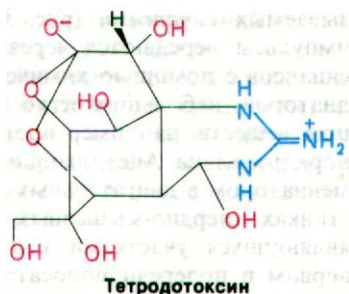
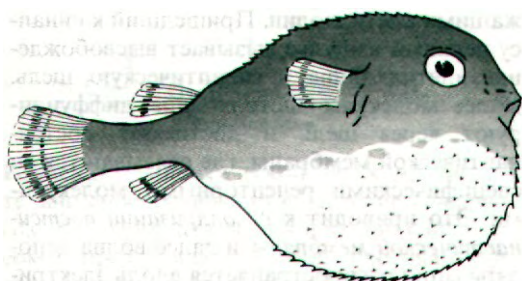


Рис. 37.4. Блокаторы Na^+ -канала.

зи с высокой специфичностью действия тетродотоксин с успехом используется при экспериментальных исследованиях. Он



Иглобрюх, считающийся в Японии деликатесом.

очень прочно ($K \approx 10^9$ М) связывается с Na^+ -каналом и блокирует поток ионов натрия, не влияя при этом на K^+ -канал. Таким же действием обладает и **сакситоксин**, вырабатываемый одним из морских динофлагеллят. Моллюски, питающиеся динофлагеллятами, в особенности съедобные двустворчатые моллюски и мидии, тоже становятся ядовитыми. Так, одна мелкая мидия может содержать сакситоксин в дозе, достаточной чтобы убить 50 человек! Общая структурная особенность тетродотоксина и сакситоксина - наличие гуанидиновой группы (рис. 37.4). Эта положительно заряженная группа токсина взаимодействует с отрицательно заряженным карбоксилат-ионом в устье канала на внеклеточной стороне мембраны. В сущности, эти токсины являются конкурентными ингибиторами Na^+ .

Тетродотоксин и сакситоксины в силу своей специфичности и высокого сродства к Na^+ -каналу оказались ценнейшими средствами анализа. Так, измерением связыва-

ния меченого тетродотоксина с высокой удельной радиоактивностью определяли плотность Na^+ -каналов в различных возбудимых мембранах. *Немиелинизированные нервные волокна, которые лишены изоляционного слоя миелина, обычно характеризуются низкой плотностью Na^+ -каналов - порядка 20 на 1 $\mu\text{м}^2$. В мембранах таких аксонов Na^+ -каналы отделены друг от друга расстоянием 2000 А. Что касается миелинизированных нервных волокон, то в специфических участках, называемых перехватами Ранвье, плотность Na^+ -каналов, напротив, достигает очень высоких значений - порядка 10^4 на 1 $\mu\text{м}^2$. Перехваты Ранвье, расположенные на аксоне с интервалом 2 мм, - это единственные участки, в которых мембрана аксона миелинизированного нерва соприкасается с внеклеточной жидкостью. Участки мембраны между перехватами Ранвье содержат очень мало каналов и не участвуют в проведении. Потенциал действия перескакивает от перехвата к перехвату, вследствие чего импульс проводится быстрее и эффективнее, чем в немиелинизированном волокне. Наличие 10^4 каналов на 1 $\mu\text{м}^2$ в перехвате Ранвье означает, что значительная часть поверхности мембраны в этой области занята Na^+ -каналами.*

Специфичность связывания тетродотоксина с Na^+ -каналами была использована также при их выделении и очистке. Для этого интегральные мембранные белки возбудимых мембран солюбилизировали с помощью детергента, после чего разделяли на ионообменнике. Связывание тетродотоксина с солюбилизированным Na^+ -каналом позволило количественно определять канал в процессе очистки. Выделенный таким путем Na^+ -канал оказался белком массой 230 кДа, состоящим из субъединиц различных типов. Сложность устройства



Рис. 37.5. Электронная микрофотография миелинизированного аксона из спинного мозга. Миелиновая оболочка аксона («обертка», образованная многочисленными слоями мембран) выполняет роль изолятора. Скорость проведения в миелинизированных нервах намного выше, чем в лишенных миелиновой оболочки нервах того же диаметра. (Печатается с любезного разрешения д-ра Cedric Raine.)

Na^+ -канала частично обусловлена, видимо, тем, что он является не только высокоизбирательной порой в мембране, но и содержит структуру, воспринимающую напряжение (сенсор напряжения). Заряженные группы этой структуры реагируют на изменение мембранного потенциала во время потенциала действия и передают информацию на ту часть канала, которая составляет пору в мембране. Действительно, до начала потока натрия через мембрану выявляется поток через канал (так называемый *воротный ток*), обусловленный движением заряженных групп в белке.

37.3. Ацетилхолин является нейромедиатором

Взаимодействие между нервными клетками осуществляется в местах их соединения, на-

зываемых *синапсами* (рис. 37.6). Нервные импульсы передаются через большинство синапсов с помощью химических нейромедиаторов - небольших легко диффундирующих веществ, например ацетилхолина или норадреналина. Ацетилхолин служит также медиатором в двигательных концевых пластинках (нервно-мышечных соединениях), являющихся участками контактов между нервом и поперечнополосатой мышцей.

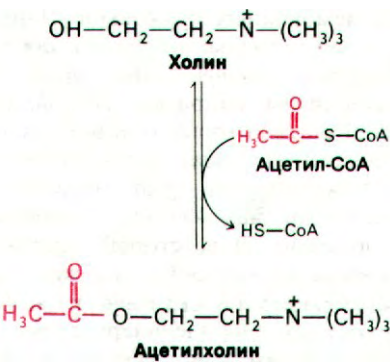
Пресинаптическая мембрана холинергического синапса (т. е. синапса, в котором в качестве нейромедиатора используется ацетилхолин) отделена от *постсинаптической мембраны* так называемой *синаптической щелью* шириной около 500 А. Окончание пресинаптического аксона наполнено *синаптическими пузырьками (везикулами)*, содержащими ацетилхолин. Пришедший к синапсу нервный импульс вызывает высвобождение ацетилхолина в синаптическую щель. Далее молекулы ацетилхолина диффундируют через щель и достигают постсинаптической мембраны, где связываются со специфическими рецепторными молекулами. Это приводит к *деполяризации постсинаптической мембраны*, и далее волна деполяризации распространяется вдоль электрически возбудимой мембраны второй нервной клетки. Ацетилхолин *гидролизует*ся *ацетилхолинэстеразой*, и постсинаптическая мембрана поляризуется вновь.

Ацетилхолин синтезируется вблизи пресинаптического окончания аксона путем переноса ацетильной группы от ацетил-СоА



Рис. 37.6. Схематическое изображение холинергического синапса.

на холин. Фермент, катализирующий эту реакцию, - *холин-ацетилтрансфераза* (холин-ацетилаза). Далее часть образовавшегося ацетилхолина попадает в синаптические пузырьки, а часть остается в цитозоле. В одном холинергическом синаптическом пузырьке (обычно 400 А диаметром) содержится около 10000 молекул ацетилхолина.



Изучению синаптической функции значительно способствовало выделение *синапсом* из гомогената нервной ткани. Синапсомы представляют собой пресинаптические окончания, образующие в процессе выделения замкнутые структуры. Они представляют собой мешочки из пресинаптической мембраны, содержащей митохондрии, цитозоль и синаптические пузырьки.

37.4. Ацетилхолин открывает в постсинаптической мембране каналы для катионов

Потенциал покоя постсинаптической мембраны или мембраны двигательной концевой пластинки составляет примерно —75 мВ. При взаимодействии ацетилхолина со специфическими рецепторами происходит резкое изменение проницаемости этих мембран (рис. 37.7). *В течение 0,1 мс значительно возрастает проводимость как Na⁺, так и K⁺, и возникает сильный ток Na⁺ внутрь клетки и более слабый ток K⁺ из клетки.* Ток Na⁺ в клетку приводит к деполяризации постсинаптической мембраны и инициирует возникновение потенциала действия в соседнем (постсинаптическом) нейроне или мышечном волокне. *Ацетилхолин раскрывает катионные каналы только одного типа, характеризующиеся почти одинаковой проницаемостью для Na⁺ и K⁺.* Если поток Na⁺ при действии ацетилхолина оказывается большим, чем поток K⁺, то это обусловлено лишь большей крутизной элек-

трохимического градиента концентрации Na⁺ по сравнению с K⁺.

Две молекулы ацетилхолина связываются с молекулой рецептора, вызывая при этом такие изменения конформации, которые открывают канал. Схематически кинетику процесса, согласующуюся с экспериментальными данными, можно описать уравнением

$$2\text{A} + \text{R} \rightleftharpoons \text{A}_2\text{R} \rightleftharpoons \text{A}_2\text{R}^*,$$

где А - молекула ацетилхолина, R - закрытый канал, R* - открытый канал. За полупериод жизни открытого канала, равный всего лишь 1 мс, по нему проходит примерно 10⁴ ионов. Продолжительное воздействие ацетилхолина на рецептор приводит к его *де-сенситизации*: канал закрывается и реакция на ацетилхолин исчезает на длительный промежуток времени.

37.5. Ацетилхолин высвобождается квантами

Проведенное Бернардом Катцем (Bernard Katz) изучение передачи нервного импульса

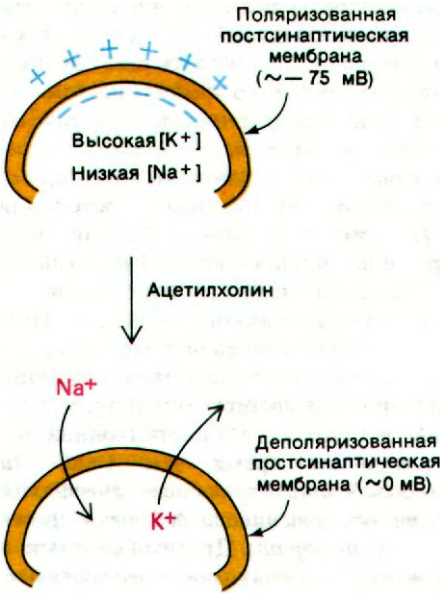


Рис. 37.7. Ацетилхолин деполяризует постсинаптическую мембрану путем увеличения Na⁺ и K⁺ проводимости.

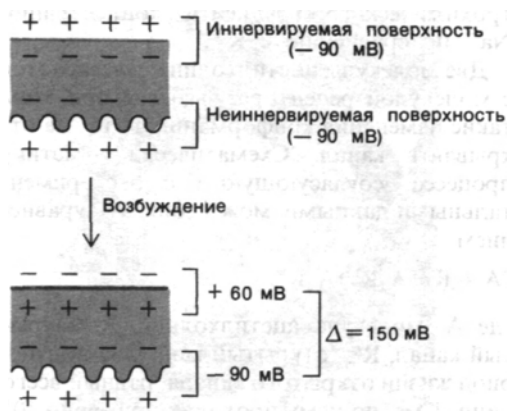


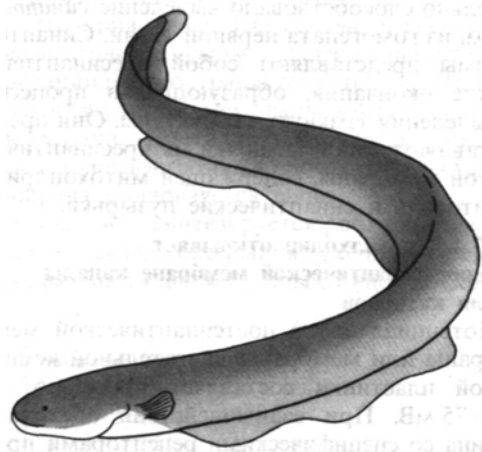
Рис. 37.8. Генерирование напряжения в электрической пластинке электрического угря.

в участках нервно-мышечного соединения показало, что ацетилхолин высвобождается из пресинаптической мембраны порциями по 10^4 молекул. Доказательство *квантового высвобождения ацетилхолина* было получено при анализе мембранного потенциала двигательных концевых пластинок, которым свойственна спонтанная электрическая активность даже в отсутствие стимуляции нерва. Деполаризующие импульсы с амплитудой $0,5 \text{ mV}$ и длительность около 20 мс возникают залпами. Это так называемые *миниатюрные потенциалы концевых пластинок*; они возникают случайно с вероятностью, сохраняющейся постоянной на протяжении длительного времени. Миниатюрный потенциал концевой пластинки вызывается спонтанным высвобождением одиночного синаптического пузырька. Полная деполаризация концевой пластинки, создаваемая потенциалом действия, обусловлена синхронным высвобождением примерно 100 «квантов» («пакетов») ацетилхолина за более короткое время чем 1 мс . Число высвобождающихся квантов ацетилхолина зависит от потенциала действия пресинаптической мембраны. Другими словами, высвобождение ацетилхолина представляет собой электрически регулируемую форму секреции. Высвобождение ацетилхолина зависит от присутствия Ca^{2+} во внеклеточной жидкости. При деполаризации пресинаптической мембраны происходит вход Ca^{2+} ,

что способствует слиянию на короткий срок мембраны синаптических пузырьков с пресинаптической мембраной.

37.6. При добавлении ацетилхолина реконструированные мембранные пузырьки становятся проницаемыми для катионов

В последние годы сделаны большие успехи в очистке ацетилхолиновых рецепторов и реконструировании функционально активных мембранных пузырьков. Наиболее подходящий исходный материал для таких исследований - *электрический орган* электрической рыбы, например *Torpedo* (электрический скат), который очень богат холинэргическими постсинаптическими мембранами. Электрический орган образован из колонок клеток, называемых *электрическими пластинками*. Одна сторона клеток (иннервируемая поверхность) снабжена нервными окончаниями и электрически возбудима. Другая сторона (неиннервируемая поверхность) образует многочисленные склад-



Electrophorus electricus, американский электрический угорь.

ки и электрически невозбудима. Разность потенциалов, возникающая при стимуляции электрических пластинок, обусловлена асимметрией ответа двух поверхностей. У такой электрической рыбы, как *Electrophorus*, мембранный потенциал иннервируемой поверхности при возбуждении сдвигается с -90 до $+60 \text{ mV}$, тогда как на неиннервируемой поверхности сохраняется -90 mV . Следовательно, в пик потенциала действия разность потенциалов между наружными

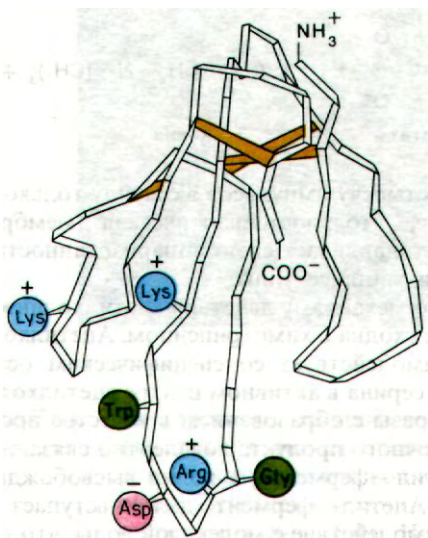


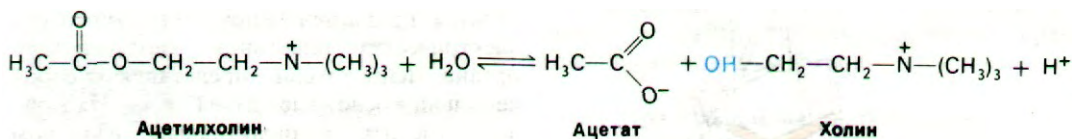
Рис. 37.9. Трехмерная структура нейротоксина, блокирующего рецептор ацетилхолина. Этот нейротоксин вырабатывается у морских змей. (Печатается с любезного разрешения д-ра Demetrius Tsernoglou и д-ра Gregory Petsko.)

поверхностями двух сторон составляет 150 мВ (рис. 37.8). Электрические пластинки электрического органа соединены параллельно, и, следовательно, их разность потенциалов складывается. Орган, состоящий из 5000 рядов электрических пластинок, может, таким образом, генерировать разряд в 750 В. Интересно отметить, что электрические пластинки электрического угря эволюционно возникли из мышечных клеток. При этом они сохранили электрически возбудимую наружную мембрану мышцы, но утратили аппарат сокращения. Электрический орган *Electrophorus* - великолепный источник Na^+ -каналов.

Еще один экзотический биологический материал оказался бесценным источником ацетилхолиновых рецепторов. Для того, чтобы идентифицировать рецептор в смеси макромолекул, его необходимо *специфически пометить*. Для этого используют нейротоксины змей, в частности *α -бунгаротоксин* из яда одной змеи с о. Тайвань и *кобротоксин* (из яда кобры). Указанные нейротоксины блокируют нейромышечное проведение, связываясь с рецепторами ацетилхолина на двигательных концевых пла-

стинках или на иннервируемой поверхности электрических пластинок электрического органа. Нейротоксины представляют собой небольшие основные белки (7 кДа). Их можно пометить радиоактивным изотопом с высокой удельной радиоактивностью. Для этого их либо иодируют иодом-125, либо превращают в шиффово основание с пиридоксальфосфатом с последующим восстановлением образованного продукта ^3M -боргидридом. Меченый кобротоксин прочно связывается с ацетилхолиновым рецептором (константа диссоциации - порядка 10^{-9} М) и, что особенно важно, практически не связывается с другими макромолекулами постсинаптической мембраны. Таким образом, рецептор ацетилхолина можно специфически пометить радиоактивным атомом.

Путем обработки фрагментов мембраны неионным детергентом (таким, как производное полиоксиэтилена твин-80) удалось солюбилизовать рецепторы ацетилхолина электрического органа. Полученный раствор фракционировали методами гель-фильтрации и ионообменной хроматографии. Последним этапом очистки была аффинная хроматография на колонке, содержащей ковалентно связанный кобротоксин. В итоге был получен рецептор, очищенный в 10000 раз. Ацетилхолиновый рецептор представляет собой комплекс массой 270 кДа, состоящий из четырех типов субъединиц. Субъединица 40 кДа метится по сродству радиоактивными соединениями, содержащими группу триметиламмония, что указывает на наличие в ней участка связывания ацетилхолина. Удалось получить мембранные пузырьки, содержащие очищенные рецепторы ацетилхолина; для этого к раствору рецепторов добавляли фосфолипиды и затем удаляли диализом детергент. Показано, что радиоактивные ионы натрия ($^{22}\text{Na}^+$), включенные в процессе реконструирования пузырьков в водное пространство, высвобождаются при добавлении ацетилхолина или его аналогов, например карбамоилхолина (рис. 37.10). Высвобождение ионов натрия блокируют бунгаротоксин и обычные антагонисты ацетилхолина; следовательно, оно опосредовано специфическим взаимодействием ацетилхолина со связанным с мембраной рецептором.



37.7. Ацетилхолин быстро гидролизруется, и конечная пластинка реполяризуется

Для восстановления возбудимости постсинаптической мембраны необходимо выключение деполяризующего сигнала. Эту функцию выполняет *ацетилхолинэстераза*, открытая Дэвидом Нахманзоном (David Nachmansohn) в 1938 г. Фермент гидролизует ацетилхолин до ацетата и холина. В результате проницаемость постсинаптической мембраны возвращается к исходному уровню и мембрана реполяризуется. Ацетилхолинэстераза локализована в синаптической щели, где она связана с сетью из коллагена и гликозамингликанов, поступающих из постсинаптической клетки. Масса фермента 260 кДа, субъединичная структура - $\alpha_2\beta_2$. Ацетилхолинэстеразу можно легко отделить от ацетилхолиновых рецепторов. Фермент характеризуется поразительно высоким числом оборотов, а именно 25000 с^{-1} . Это означает, что одна молекула ацетилхолина расщепляется за 40 мкс. Такое высокое число оборотов фермента имеет очень важное значение для быстрого восстановления поляризованного состояния постсинаптической мембраны. Синапсы способны переда-

вать тысячу импульсов в секунду только потому, что постсинаптическая мембрана восстанавливает свою поляризованность за доли миллисекунды.

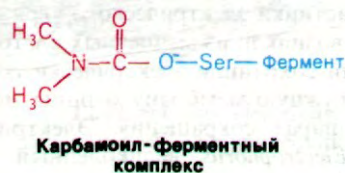
По механизму действия ацетилхолинэстераза сходна с химотрипсином. Ацетилхолин взаимодействует со специфическим остатком серина в активном центре ацетилхолинэстеразы с образованием в качестве промежуточного продукта ковалентно связанного ацетил—фермента, а холин высвобождается. Ацетил—фермент далее вступает во взаимодействие с молекулой воды, что приводит к образованию ацетата и регенерированного свободного фермента (рис. 37.12).

37.8. Ингибиторы ацетилхолинэстеразы используются как лекарственные средства и как яды

Терапевтические и токсические свойства ингибиторов ацетилхолинэстеразы нашли широкое практическое применение. Алкалоид из калабарских бобов *физостигмин* (называемый также *эзерин*) когда-то использовался при испытании ядом в судилище над колдунами и ведьмами. Физостигмин и родственные ему ингибиторы, например неостигмин, являются *карбамоильными эфирами* (рис. 37.13). Они ингибируют ацетилхо-



Рис. 37.10. Ацетилхолин вызывает высвобождение Na^+ из реконструированных мембранных пузырьков, содержащих ацетилхолиновый рецептор. По оси ординат отложено содержание $^{22}\text{Na}^+$ в синаптических пузырьках.



линэстеразу путем образования ковалентного промежуточного соединения, которое очень медленно гидролизруется. Неостигмин связывается с ацетилхолинэстеразой таким образом, что его положительно заряженная триметиламмониевая группа встает в анионном участке фермента, а карбамоильная группа оказывается рядом с реакционноспособным остатком серина в участке этерификации. Далее происходит карбамоилирование фермента и высвобождается образующийся спирт. *Последующий гидро-*

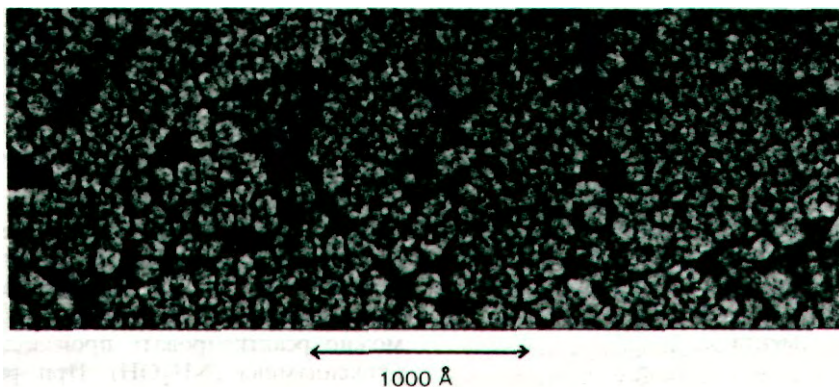


Рис. 37.11. Электронная микрофотография ацетилхолиновых рецепторов в постсинаптической мембране. (Печатается с любезного разрешения д-ра John Heuser и д-ра Steven Salpeter.)

лиз карбамоильного производного фермента в отличие от гидролиза ацетил—фермента происходит с очень низкой скоростью. В итоге активный центр ацетилхолинэстеразы оказывается прочно заблокированным. Неостигмин используется для лечения глаукомы - болезни глаз, характеризующейся повышенным внутриглазным давлением. Механизм терапевтического эффекта состоит в том, что неостигмин ингибирует ацетилхолинэстеразу и тем самым усиливает действие ацетилхолина.

Еще более мощные ингибиторы ацетилхолинэстеразы - органические фторфосфаты, в частности диизопропилфторфосфат (ДИФФ). Эти соединения реагируют с ацетилхолинэстеразой, образуя высокостабильные ковалентные фосфорил-ферментные комплексы (рис. 37.14). Как и при взаимодействии с сериновыми протеиназами, фосфорильная группа ДИФФ связывается с серином в активном центре фермента.

Множество различных органических фторфосфатов было синтезировано для использования в качестве инсектицидов в сельском хозяйстве, а также в качестве отравляющих веществ - нервно-паралитических ядов в химической войне (рис. 37.15). Эти соединения могут вызвать смерть путем остановки дыхания. Наиболее токсичны из них - табун и зарин. Паратион - инсектицид, нашедший широкое применение в сельском хозяйстве.

Путем использования радиоактивного ДИФФ в качестве метки было определено число молекул ацетилхолинэстеразы в концевой пластинке нерва в диафрагмальной мышце мыши. Плотность фермента составила 12000 мкм^{-2} , что почти равно числу рецепторов ацетилхолина, определенному с помощью радиоактивных нейротоксинов. Таким образом, постсинаптическая мембрана очень богата и ацетилхолинэстеразой, и ацетилхолиновыми рецепторами. При передаче нервных импульсов, поступающих с малой частотой, используется только небольшая доля общего числа молекул фермента. Однако проведение при высокой частоте импульсации требует участие множества молекул ацетилхолинэстеразы.

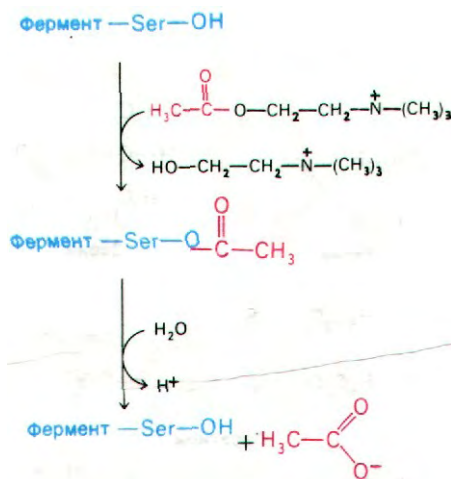


Рис. 37.12. Механизм каталитического действия ацетилхолинэстеразы.

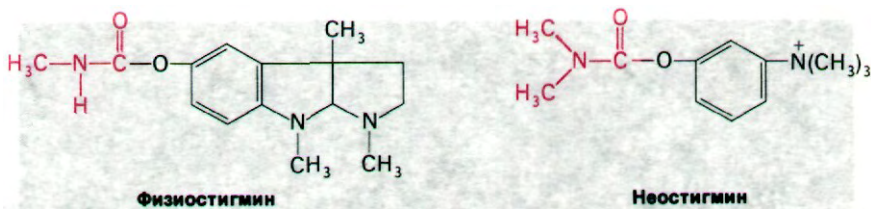


Рис. 37.13. Физостигмин и неостигмин ингибируют ацетилхолинэстеразу путем карбамоилирования серина в активном центре фермента.

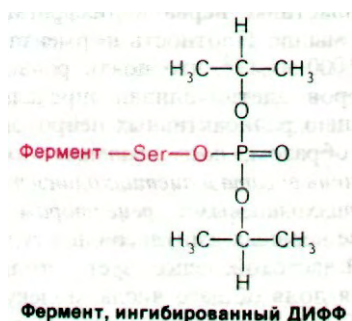


Рис. 37.14. Ингибированная диизопропилфторфосфатом ацетилхолинэстераза.

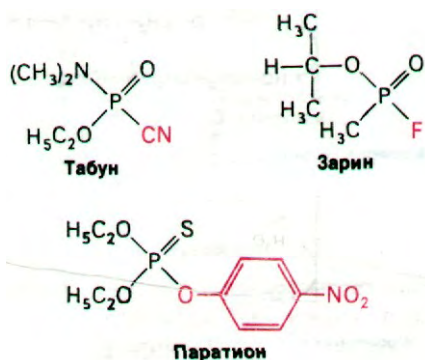
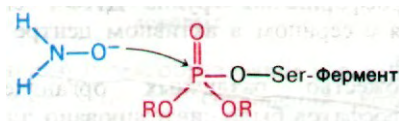


Рис. 37.15. Структурные формулы нескольких органических фосфатов - ингибиторов ацетилхолинэстеразы.

37.9. Разработка антидота для лечения отравлений органическими фосфатами

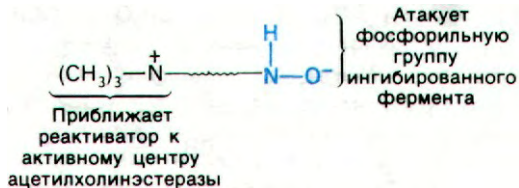
Ацетилхолинэстеразу, ингибированную органическими фторфосфатами типа ДИФФ, можно реактивировать производными гидроксиламина (NH_2OH). При разработке антидота исходили из обнаруженного Ирвином Уилсоном (Irvin Wilson) факта, что гидроксиламин высвобождает фосфорильную группу, присоединенную к сериновому остатку ингибированного фермента, и тем самым реактивирует его (рис. 37.16). Задача состояла в том, чтобы приспособить эту реакцию для клинического использования. Однако гидроксиламин нельзя использовать *in vivo*, поскольку в тех высоких концентрациях, которые необходимы для реактивации ацетилхолинэстеразы, ингибированной ДИФФ, он токсичен. Выбранный Уилсоном подход состоял в том, чтобы найти соединение, обладающее реакционной способностью гидроксиламина, но со специфичностью и очень высоким сродством к ацетилхолинэстеразе. Относительно фермента было известно, что на нем есть анионный участок для связывания положительно заряженного остатка холина в ацетилхолине, и потому представлялось целесообразным синтезировать производное гидроксиламина, содержащее четвертичную аммониевую группу. Возникал, однако, вопрос, где должен стоять заместитель: при атоме кислорода или азота гидроксиламина? Было обнаружено, что О-метилги-



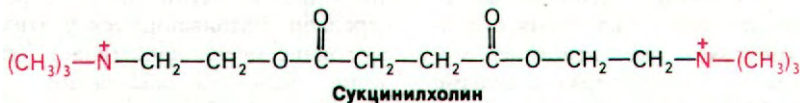
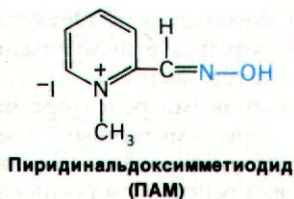
доксиламин лишен способности реактивировать фермент, тогда как N-метилгидроксиламин обладал такой активностью. Гидроксильная группа реактиватора не может быть замещена, поскольку именно анионная форма соединения атакует атом фосфора в ингибированном ферменте.

Следующий и основной этап состоял в том, чтобы поместить четвертичную ам-

миевую группу на необходимом расстоянии от нуклеофильного атома кислорода. Более того, требовалось, чтобы по своей ориентации эти группы были комплементарны анионному участку и атому фосфора в ингибированном ферменте.



В качестве реактиваторов были испытаны многочисленные соединения, содержащие четвертичную аммониевую группу и гидроксиламинную функцию. Наиболее эффективным



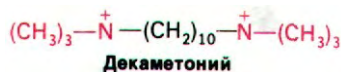
среди них оказался 2-пиридинальдоксиметиодид (ПАМ). Это соединение обладает устойчивой геометрией благодаря двойной связи в оксиме, которая способствует удержанию атома кислорода в плоскости кольца.

ПАМ реактивирует ингибированную ДИФФ ацетилхолинэстеразу в принципе по тому же механизму, что и гидроксиламин. Однако по эффективности 10^{-6} М ПАМ соответствует 1 М гидроксилamina. Такое повышение эффективности в 1000000 раз позволяет использовать ПАМ для лечения отравлений органическими фосфатами. Удивительная эффективность ПАМ обусловлена оптимальным расположением четвертичной аммониевой группы по отношению к нуклеофильному атому кислорода. Разработка этого препарата явилась вехой в развитии рационального подхода к синтезу лекарственных препаратов.

37.10. Ингибиторы ацетилхолинового рецептора

Блокаторами нервно-мышечного проведения служат также соединения, непосред-

ственно воздействующие на ацетилхолиновый рецептор. К ним относится кураре, который на протяжении столетий использовали южноамериканские индейцы. Вскоре после возвращения Колумба из Америки д'Ангера в своем сочинении «De Orbo novo» отмечал, что «местные жители отравляли стрелы соком смертельно-ядовитой травы». Одним из активных компонентов кураре является *d*-тубокурарин (рис. 37.17). Тубокурарин ингибирует деполяризацию концевых пластинок, конкурируя с ацетилхолином за связывание с рецептором. Аналогичным путем действуют α -бунгаротоксин и кобратаксин. В отличие от этого вещества типа дека-



метония соединения связываются с рецептором ацетилхолина, вызывая устойчивую деполяризацию концевой пластинки.

В хирургии в качестве препарата, вызывающего расслабление мышц, используется аналог ацетилхолина - сукцинилхолин.

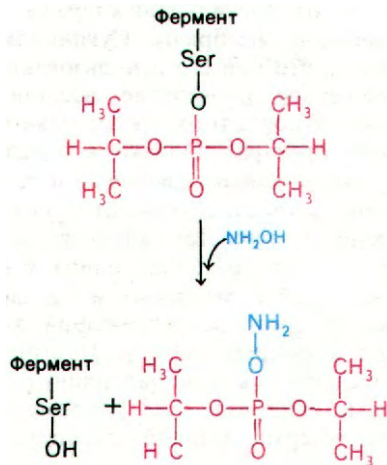


Рис. 37.16. Реактивация гидроксиламином ацетилхолинэстеразы, ингибированной диизопропилфторфосфатом.

37. Возбудимые мембраны и сенсорные системы

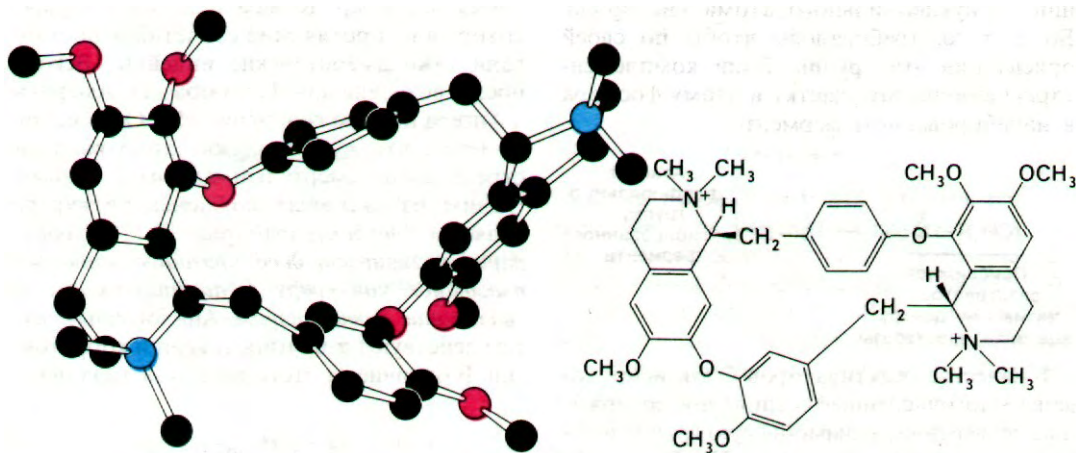


Рис. 37.17. Формула и модель *d*-тубокурарина.

Сукцинилхолин крайне медленно гидролизруется ацетилхолинэстеразой в постсинаптической мембране. Вследствие этого он вызывает устойчивую деполяризацию концевой пластинки. В то же время сукцинилхолин гидролизруется под действием менее специфических холинэстераз в плазме и в печени; эти ферменты назвали *плазменными ацетилхолинэстеразами* или *псевдохолинэстеразами* для того, чтобы отличить их от ацетилхолинэстеразы постсинаптической мембраны. Сукцинилхолин удобен тем, что при его использовании нервно-мышечное проведение восстанавливается вскоре после того, как перестают вводить этот препарат. Однако в отдельных случаях мышечное расслабление и паралич дыхательных мышц сохраняются на протяжении многих часов. Дело в том, что в таких случаях гидролиз сукцинилхолина у больных идет крайне медленно из-за сильно сниженного сродства плазменной холинэстеразы к сукцинилхолину. Повышенная чувствительность к сукцинилхолину [так же как и памахину (разд. 15.11)] - пример генетически детерминированной лекарственной идиосинкразии.

Если кроликов иммунизировать очищенными ацетилхолиновыми рецепторами, то спустя несколько недель после иммунизации у них наблюдается мышечная слабость

и быстрая утомляемость. Объясняется это тем, что в результате иммунизации у них вырабатываются антитела, реагирующие с ацетилхолиновыми рецепторами их собственных нервно-мышечных соединений. В итоге число функционально активных ацетилхолиновых рецепторов уменьшается, что приводит к ухудшению нейромышечной передачи. Развивающееся у этих кроликов состояние очень напоминает тяжелую болезнь человека - *миастению* (*myasthenia gravis*), и, действительно, в сыворотке больных миастенией содержатся антитела, направленные против собственных рецепторов ацетилхолина. Другими словами, *myasthenia gravis* является *аутоиммунным заболеванием*, т. е. таким заболеванием, при котором организм оказывается мишенью действия собственной иммунной системы.

37.11. К числу нейромедиаторов относятся также катехоламины и γ -аминомасляная кислота (ГАМК)

Помимо ацетилхолина, известны и другие нейромедиаторы. Вещество считается нейромедиатором, если оно удовлетворяет следующим критериям. Во-первых, микроинъекции предполагаемого нейромедиатора в синаптическую щель должны вызывать такой же ответ, как возбуждение пресинаптического нерва. Во-вторых, это вещество должно в больших количествах присутствовать в пресинаптических нервных окончаниях. В этом отношении наиболее весомым критерием служит выделение синаптических пузырьков, содержащих это вещество. В-третьих, постулированный медиатор должен высвобождаться из пресинаптиче-

ского нерва в нужное время и в количестве, достаточном для воздействия на постсинаптический нерв.

Этим критериям удовлетворяет ряд катехоламинов. Так, норадреналин является медиатором в гладкомышечных соединениях, которые иннервируются симпатическими нервами (в отличие от парасимпатических соединений, в которых нейромедиатором служит ацетилхолин). Катехоламины адреналин и дофамин - два других катехоламиновых нейромедиатора. Указанные катехоламины синтезируются из тирозина в окончаниях симпатических нервов и в надпочечниках (рис. 37.18). Первый этап синтеза (реакция, лимитирующая скорость всего процесса) - гидроксилирование тирозина с образованием 3,4-дигидроксифенилаланина (ДОФА). Данная реакция катализируется тирозин-гидроксилазой - ферментом, аналогичным фенилаланин-гидроксилазе. Активатором молекулярного кислорода при этом служит тетрагидробиоптерин - кофактор фермента. Второй этап синтеза - декарбоксилирование ДОФА, катализируемое ДОФА-декарбоксилазой (ферментом, содержащим пиридоксальфосфат) с образованием 3,4-дигидроксифенилэтиламина (дофамина). Далее дофамин гидроксилируется в норадреналин в присутствии медьсодержащей гидроксилазы. Наконец, из норадреналина в результате метилирования образуется адреналин; фермент, осуществляющий эту реакцию, - трансметилаза, использующая в качестве донора метильных групп S-аденозилметионин.

Инактивация катехоламиновых нейромедиаторов осуществляется путем метилирования 3-ОН-группы катехолового кольца. Реакцию катализирует *катехол-O-метилтрансфераза*, использующая S-аденозилметионин в качестве донора метильной группы. Другой путь инактивации этих нейромедиаторов - удаление аминогруппы в ходе окисления *моноаминоксидазой* (рис. 37.19).

Среди производных аминокислот выявлен еще один нейромедиатор. Это γ -аминобутират, называемый также *γ -аминомасляной кислотой (ГАМК)*. ГАМК увеличивает проницаемость постсинаптических мембран для K^+ и тем самым отдаляет мембранный потенциал от порогового уровня, при котором возникает потенциал действия; таким образом, ГАМК - это тормозный нейромедиатор. ГАМК образуется при декарбоксилировании глутамата в реакции, ката-



Рис. 37.18. Путь биосинтеза катехоламиновых нейромедиаторов.

лизуемой глутамат-декарбоксилазой (рис. 37.20). Нетрудно предугадать, что простетической группой этой декарбоксилазы служит пиридоксальфосфат. γ -Аминобутират инактивируется путем трансаминирования с образованием полуальдегида янтарной кислоты, который далее окисляется в сукцинат.

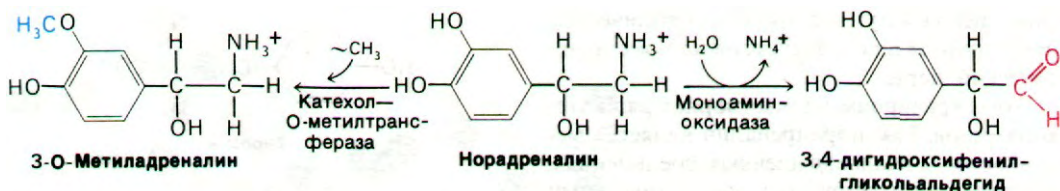


Рис. 37.19. Инактивация норадреналина.

37.12. Для возбуждения палочки сетчатки глаза достаточно одного фотона

Рассмотрим теперь возбудимые рецепторы, активируемые светом. У человека имеются два типа фоторецепторных клеток, называемых палочками и колбочками в соответствии с их формой. Колбочки функционируют на ярком свете и ответственны за цветовое зрение, тогда как палочки воспринимают слабый свет, но не различают цвета. В сетчатке глаза человека содержится 3 млн. колбочек и 1 млрд. палочек. Эти фоторецепторные клетки преобразуют энергию света в движение атомов, а далее и в нервный импульс. Палочки и колбочки образуют синапсы с биполярными клетками, которые

в свою очередь взаимодействуют с другими нервными клетками в сетчатке. Электрические сигналы, генерированные фоторецепторными клетками, преобразуются, проходя по сложной сети нервных клеток в сетчатке, и затем передаются в мозг по волокнам зрительного нерва. Таким образом, сетчатка выполняет две функции, а именно трансформирует свет в нервные импульсы и интегрирует зрительную информацию.

В 1938 г. Зелиг Хехт (Selig Hecht) открыл, что для возбуждения палочки (клетки) сетчатки человека достаточно одного фотона. Рассмотрим молекулярную основу исключительно высокой чувствительности этих клеток. Палочки представляют собой тонкие удлинённые структуры диаметром обычно 1 мкм и длиной 40 мкм. Основные функции этой клетки четко разделены пространственно (рис. 37.22). Наружный сегмент палочки специализирован для фоторецепции. В нем содержится примерно 1000 дисков, сложенных стопкой (рис. 37.23). Диски представляют собой закрытые уплотненные мешочки толщиной около 160 А. Эти мембранные структуры насыщены фоторецепторными молекулами. Мембраны дисков и плазматическая мембрана наружного сегмента не соприкасаются. Тонкая ресничка соединяет наружный сегмент с внутренним сегментом, богатым митохондриями и рибосомами. Во внутреннем сегменте с очень высокой скоростью вырабатывается АТФ и идет активный синтез белков. Диски наружного сегмента имеют срок жизни всего лишь 10 дней и постоянно обновляются. Внутренний сегмент соприкасается с ядром, расположенным рядом с синаптическим тельцем. Синаптическое тельце, в котором содержится много синаптических пузырьков, образует синапс с биполярными клетками.

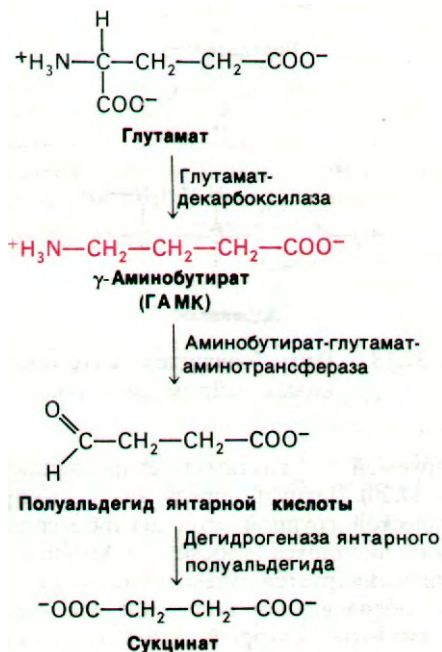


Рис. 37.20. Синтез и инактивация γ-аминобутирата.

37.13. Родопсин - фоторецепторный белок палочек

Для стимуляции фоторецепторных клеток необходимо поглощение света. Поглощение фотона света должно вызвать структурные изменения светопоглощающей группировки

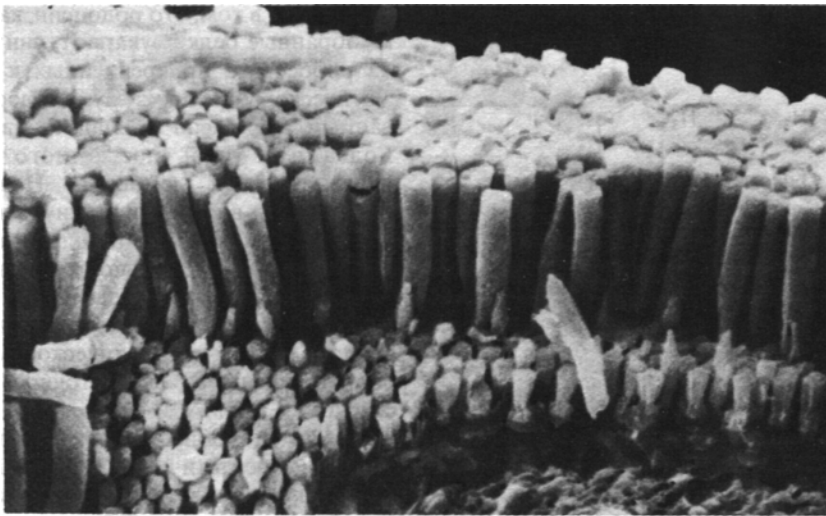


Рис. 37.21. Микрофотография клеток палочек сетчатки, полученная в сканирующем электронном микроскопе. (Печатается с любезного разрешения д-ра Deric Bownds.)

N-конец расположен в водной фазе внутри диска, а С-конец - на другой стороне мембраны диска, в цитозоле. N-концевая область родопсина содержит две олигосахаридные единицы, ковалентно присоединенные к аспарагиновой боковой цепи.

(хромфора). Фоточувствительным веществом палочек является *родопсин*, состоящий из белка *опсина* и простетической группы, представленной *11-цис-ретиналом* (рис. 37.24). Родопсин представляет собой трансмембранный белок массой 38 кДа. Его



Рис. 37.22. Схематическое изображение палочки сетчатки.

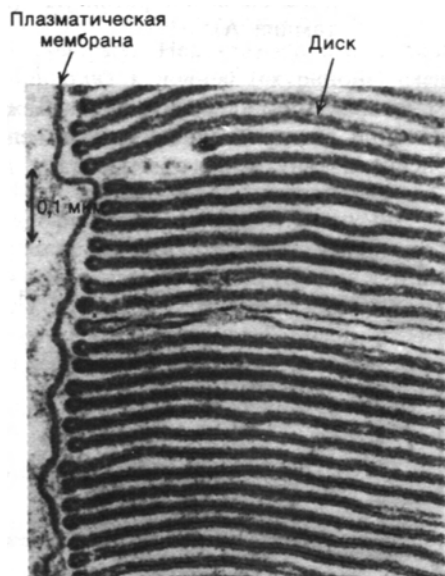


Рис. 37.23. Наружный сегмент палочки сетчатки под электронным микроскопом. Видны уложенные стопкой диски. (Allen J. M., ed., Molecular organization and biological function, Harper and Row, 1967.)



Рис. 37.24. Структура 11-цис-ретиная, полностью-транс-ретиная и полностью-транс-ретинола (витамина А).

Этим сахарам, по-видимому, принадлежит важная роль в направленном передвижении родопсина из внутреннего сегмента к ди-

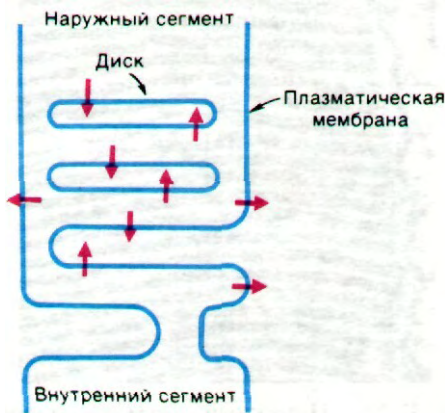


Рис. 37.25. Образование дисков путем инвагинации плазматической мембраны. Стрелками показана полярность молекул родопсина.

скам. Дело в том, что родопсин, как и другие мембранные белки эукариот, синтезируется на рибосомах, прикрепленных к эндоплазматическому ретикулуму. Новосинтезированный родопсин попадает в аппарат Гольджи и лишь после этого достигает плазматической мембраны. Новые диски образуются в основании внутреннего сегмента путем инвагинации плазматической мембраны, и именно поэтому углеводные единицы родопсина оказываются локализованными внутри диска, хотя первоначально, входя в состав плазматической мембраны, они обращены во внеклеточное пространство (рис. 37.25).

Опсин, подобно другим белкам, лишенным протестических групп, не поглощает видимого света. Цвет родопсина и его чувствительность к свету определяются присутствием 11-цис-ретиная, являющегося высокоэффективным хромофором. Благодаря 11-цис-ретинолу родопсин обладает широкой полосой поглощения в видимой области спектра с максимумом при 500 нм, что прекрасно соответствует солнечному излучению. Примечательна также интенсивность поглощения видимого света родопсином. Коэффициент экстинкции родопсина при 500 нм очень высок, а именно $4 \cdot 10^4 \text{ см}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ (рис. 37.26). Суммарная сила поглощения видимого света родопсином приближается к максимальным значениям для органических соединений. Высокие хромофорные качества 11-цис-ретиная обусловлены тем, что он является *полиеном*. Чередование в нем шести одинарных и двойных (ненасыщенных) связей создает длинную ненасыщенную систему для переноса электрона.

11-цис-ретиаль присоединен к родопсину через *шиффово основание*, которое образуется при связывании альдегидной группы

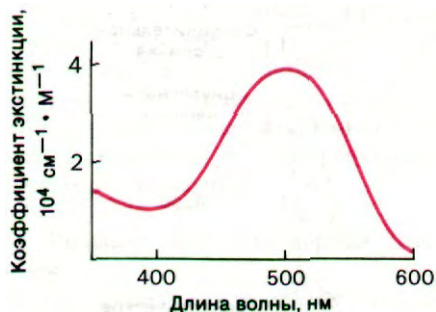


Рис. 37.26. Спектр поглощения родопсина.

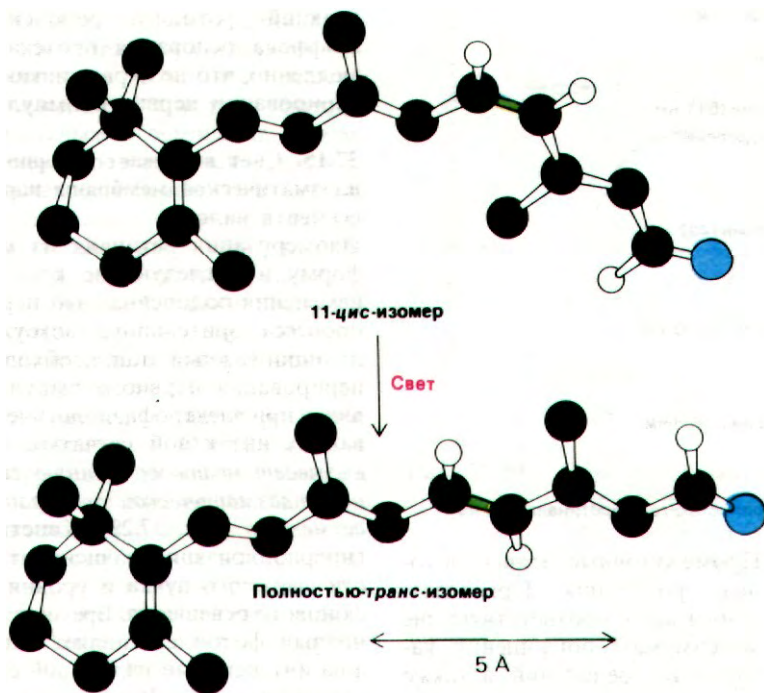


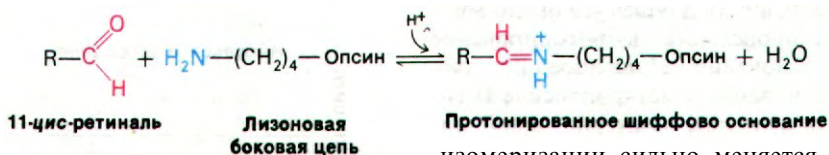
Рис. 37.27. Первичный акт при возбуждении светом - это изомеризация 11-*цис*-изомера шиффова основания, образуемого ретиналом, в полностью-*транс*-форму. Двойная связь между С-11 и С-12 показана зеленым цветом.

11-*цис*-ретиная с ϵ -аминогруппой специфического остатка лизина в опсине. Спектральные свойства родопсина свидетельствуют о том, что шиффово основание находится в протонированной форме.

ретиная-изомеразы двойная связь между С-11 и С-12 изомеризуется из *транс*-формы в *цис*-форму. Недостаточность витамина А приводит к *ночной* («куриной») *слепоте* и в конечном итоге к повреждению наружных сегментов палочек.

37.14. Свет вызывает изомеризацию 11-*цис*-ретиная

Первичный акт в процессе зрительного возбуждения известен. Как показал Джордж Уолд (George Wald), свет вызывает изомеризацию 11-*цис*-ретиной группы родопсина в полностью-*транс*-ретиная. В результате



Предшественником 11-*цис*-ретиная служит полностью-*транс*-ретинол (витамин А), который в организме млекопитающих не может синтезироваться *de novo*. Полностью-*транс*-ретинол (рис. 37.24) превращается в 11-*цис*-ретиная в два этапа. Сначала происходит окисление спиртовой группы в альдегидную в присутствии ретинол-дегидрогеназы и NADP^+ в качестве акцептора электронов. Затем под действием

изомеризации сильно меняется геометрия ретиная (рис. 37.27). Образованное ретинаям шиффово основание передвигается по отношению к области кольца хромофора примерно на 5 Å. В сущности, поглощенный фотон преобразуется в движение атомов.

Значительная изомеризация ретиная происходит практически в первые несколько

37. Возбудимые мембраны и сенсорные системы



Рис. 37.28. Промежуточные этапы фотолиза родопсина. Приведены длины волн, соответствующие максимумам поглощения каждого из соединений, а также постоянная времени каждого из превращений.

пикосекунд после поглощения фотона, о чем можно судить по появлению новой полосы поглощения после сильного импульсного освещения лазером. Образующийся при этом промежуточный продукт фотолиза, называемый *батородопсином* (или *прелюмиродопсином*), содержит напряженную полностью-*транс*-форму хромофора. Далее и ретиналь, и белок продолжает изменять свою конформацию, что приводит к образованию ряда промежуточных продуктов, различающихся по спектральным свойствам (рис. 37.28). При переходе от метародопсина I к метародопсину II, длящемуся около миллисекунды, происходит депротонирование шиффова основания. Лишенное протона шиффово основание в метародопсине II гидролизуется в течение примерно одной минуты с образованием опсина и полностью-*транс*-ретиная; последний путем диффузии отделяется от опсина, поскольку не соответствует участку связывания 11-*цис*-изомера. Полностью-*транс*-ретиаль в темноте изомеризуется снова в 11-*цис*-ретиаль, который связывается с опсином, и таким путем регенерируется родопсин. В отличие от

реакций фотолиза родопсина гидролиз шиффова основания протекает настолько медленно, что не играет никакой роли в генерировании нервного импульса.

37.15. Свет вызывает гиперполяризацию плазматической мембраны наружного сегмента палочек

Изомеризация ретиная из *цис*- в *транс*-форму и последующие конформационные изменения родопсина - это первичные акты процесса зрительного возбуждения. Следующий важный этап, необходимый для генерирования нервного импульса, был выявлен при электрофизиологических исследованиях интактной сетчатки. *Квант света вызывает кратковременную гиперполяризацию плазматической мембраны наружных сегментов* (рис. 37.29). Кинетика процесса гиперполяризации зависит от интенсивности светового пучка и уровня устойчивого фонового освещения. Время реакции на единственный фотон составляет около секунды, а на интенсивный падающий свет - несколько миллисекунд. В палочках не возникает потенциала действия. Их реакция на свет может быть различной силы. Величина сигнала, идущего от наружного сегмента к синапсу, зависит от числа поглощенных фотонов. Если взять обладающие полной чувствительностью адаптированные к темноте палочки, то полумаксимальный уровень гиперполяризации наблюдается при поглощении всего лишь 30 фотонов наружным сегментом палочки, содержащим $40 \cdot 10^6$ молекул родопсина (рис. 37.30). Поглощение единичного фотона адаптированной к темноте палочкой вызывает гиперполяризацию порядка 1 мВ, что улавливается синапсом и передается на другие нейроны сетчатки. Исключительная чувствитель-

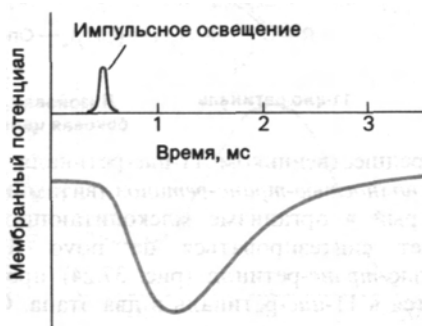


Рис. 37.29. Под действием света происходит гиперполяризация палочек сетчатки.

ность - не единственное выдающееся свойство палочек. Их вторая поразительная особенность состоит в том, что реакция световоспринимающего аппарата фотодетектора на импульсное освещение зависит от уровня фоновой освещенности. Для возбуждения палочек, освещенных постоянным светом, требуется значительно больше фотонов, чем для палочек, находящихся в темноте (рис. 37.30). Благодаря этому свойству, называемому *адаптацией*, палочки сетчатки способны функционировать при уровнях фоновой освещенности, различающихся на много порядков величины.

Каков ионный механизм индуцированной светом гиперполяризации? Плазматическая мембрана наружного сегмента палочки в темноте высоко проницаема для Na^+ . Это обстоятельство наряду с наличием высокого трансмембранного градиента концентраций Na^+ приводит к тому, что в темноте ионы натрия быстро входят внутрь наружного сегмента. Этот градиент поддерживается ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-АТФазой, локализованной в плазматической мембране внутреннего сегмента. Таким образом, в темноте ионы натрия входят в наружный сегмент, диффундируют далее во внутренний сегмент и затем выводятся с помощью насоса, работающего за счет энергии АТФ. Свет как-то образом блокирует Na^+ -каналы в плазматической мембране наружного сегмента. В результате ток Na^+ , направленный внутрь клетки, снижается и мембрана с внутренней стороны становится более электроотрицательной. Другими словами, мембранный потенциал палочек при освещении сдвигается в сторону равновесного K^+ -потенциала. Далее индуцированная светом гиперполяризация вблизи освещенных дисков пассивно передается по плазматической мембране на синаптическое тельце.

37.16. Медиаторы передают сигнал от фотолизованного родопсина на плазматическую мембрану

Изменение проницаемости плазматической мембраны для Na^+ и последующая гиперполяризация - это многократно усиленные реакции наружного сегмента на свет. В самом деле, поглощение всего лишь одного фотона адаптированной к темноте палочкой блокирует ток более чем миллиона ионов натрия. Как возникает усиление такого масштаба? Прежде всего следует обратить внимание на то, что мембраны дисков, содержащие основную массу молекул родоп-

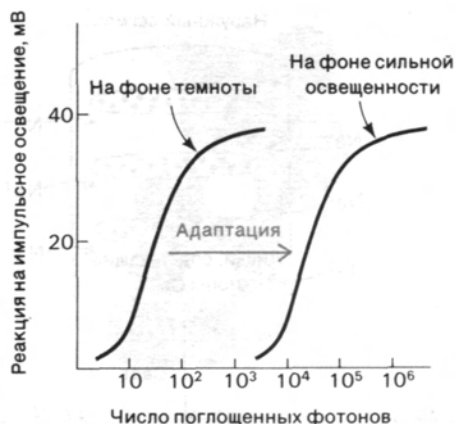


Рис. 37.30. Чувствительность палочек сетчатки к импульсному освещению зависит от фонового уровня освещенности.

сина, не соприкасаются с плазматической мембраной палочек и не сопряжены с ней электрически. Более того, молекула родопсина, поглотившая фотон, может быть удалена от натриевого канала плазматической мембраны на несколько тысяч ангстрем. Все это исключает возможность прямого взаимодействия между дисками и плазматической мембраной. Практически не может быть сомнений в том, что сигнал от фотолизованного родопсина (Рд^*) в мембранах дисков передается на плазматическую мембрану с помощью диффундирующих медиаторов. При этом для обеспечения той высокой степени усиления, которая реально наблюдается, фотолиз одной молекулы родопсина должен сопровождаться образованием (или распадом) большого числа молекул медиатора.

Природа медиатора не установлена еще окончательно; проведенные исследования позволили выдвинуть на эту роль двух достаточно вероятных кандидатов: ионы Ca^{2+} (рис. 37.31) и циклический GMP (рис. 37.32). В пользу Ca^{2+} как медиатора свидетельствуют следующие экспериментальные данные.

1. Натриевые каналы в плазматической мембране закрываются при повышении содержания Ca^{2+} в цитозоле и открываются при его понижении.
2. При введении в цитозоль хелатирующую

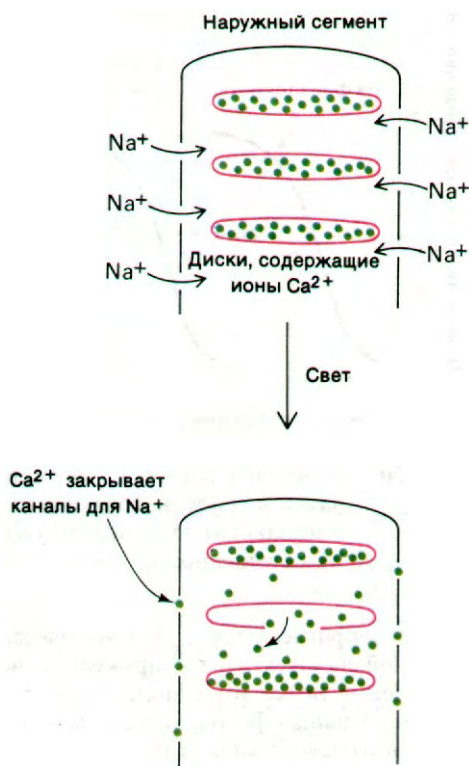


Рис. 37.31. Схематическое изображение гипотезы о роли ионов кальция как медиаторов при зрительном возбуждении.

щих агентов, специфически связывающих Ca²⁺, чувствительность палочек к свету уменьшается. Такая десенсибилизация указывает на то, что фотолиз одной молекулы родопсина ведет к высвобождению в цитозоль нескольких сотен ионов Ca²⁺.

3. После импульсного воздействия светом из наружных сегментов палочек выводится много Ca²⁺.

Однако, судя по результатам других экспериментов, медиатором может быть cGMP. Решающее значение для этого заключения имеют следующие данные.

1. Натриевые каналы плазматической мембраны открываются при повышении содержания cGMP в цитозоле и закрываются при снижении содержания этого нуклеотида.

2. Содержание cGMP регулируется светом. В частности, под действием света происходит активация фосфодиэстеразы, гидролизующей cGMP, что будет описано несколько ниже.

3. Фотолиз одной молекулы родопсина ведет к быстрому гидролизу 10⁵ молекул cGMP.

37.17. Свет снижает содержание циклического GMP путем активации фосфодиэстеразы

Как показывают приведенные экспериментальные данные, возбудимость палочек зависит и от Ca²⁺, и от cGMP. Взаимодействие этих агентов может играть решающую роль в зрительном возбуждении. Что касается молекулярного механизма индуцированного светом высвобождения Ca²⁺

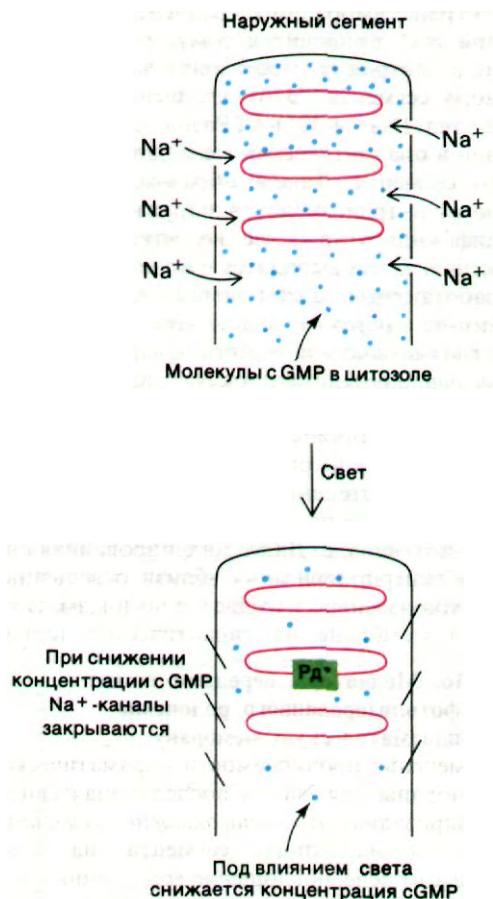
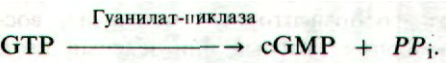
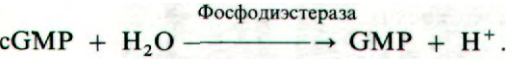


Рис. 37.32. Схематическое изображение гипотезы о роли cGMP как медиатора при зрительном возбуждении. Рд* - фотолизированный родопсин.

в цитозоль, то в этом вопросе еще много неясного. Что же касается регуляции светом содержания cGMP в наружных сегментах палочек, то в изучении этого вопроса в последние годы был достигнут значительный прогресс. На гуанилат-циклазу - фермент, катализирующий синтез cGMP, - свет, по-видимому, не оказывает существенного влияния:



Зато на фосфодиэстеразу, гидролизующую cGMP, свет оказывает поразительное по силе действие:



В результате освещения активность фосфодиэстеразы возрастает в несколько сотен раз. Стимуляция этого фермента фотолизированным родопсином опосредована регуляторным белком, называемым *трансдуцином*. В темноте трансдуцин содержит прочно связанную молекулу GDP. При освещении фотолизированный родопсин образует комплекс с GDP-трансдуцином и катализирует обмен GDP на GTP (рис. 37.34). Возникающий комплекс GTP-трансдуцин активирует фосфодиэстеразу. *Крайне важное значение имеет то обстоятельство, что всего лишь одна фотолизированная молекула родопсина катализирует обмен GDP на GTP на нескольких сотнях молекул трансдуцина, что в свою очередь активирует сотни молекул фосфодиэстеразы.* Следовательно, если число оборотов фосфодиэстеразы составляет примерно 10^3 с^{-1} , то на свету в течение секунды гидролизует уже более 10^5 молекул cGMP в расчете на одну молекулу фотолизированного родопсина. Система возвращается в исходное темновое состояние благодаря встроенной в нее GTP-азной активности. Присоединенный к трансдуцину GTP подвергается медленному гидролизу с образованием GDP-трансдуцина, неспособного активировать фосфодиэстеразу. Таким образом, весь этот цикл протекает за счет свободной энергии гидролиза GTP. Здесь мы видим пример того, как для усиления сигнала используется ~Р. Описанный каскад реакций, регулирующих содержание cGMP (рис. 37.35), очень напоминает каскад реакций, опосредующих действие β-адренергических гормонов, в частности адреналина (разд. 35.4).

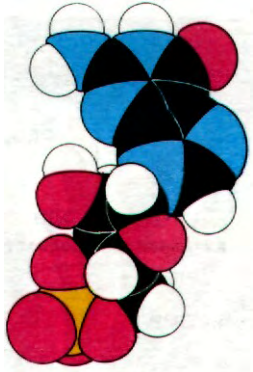


Рис. 37.33. Молекулярная модель циклического GMP.

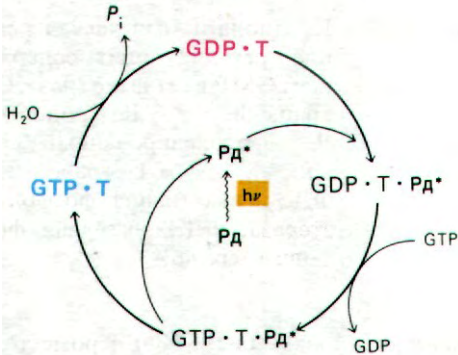


Рис. 37.34. Фотолизированный родопсин (РД*) катализирует образование комплекса GTP с трансдуцином; этот комплекс в свою очередь активирует фосфодиэстеразу циклического GMP. [Fung B. K.-K., Stryer L., Proc. Nat. Acad. Sci., 77, 2503 (1980).]

37.18. Цветовое зрение опосредуется фоторецепторами трех типов

В 1802 г. Томас Юнг (Thomas Young) высказал предположение, что цветовое восприятие опосредовано *тремя основными рецепторами*. Как показали спектрофотометрические исследования интактной сетчатки, проведенные более 150 лет назад, в глазу *существует три типа клеток-колбочек, а именно клетки, поглощающие синий, зеленый и красный свет.* Для получения спектра поглощения этих трех фоторецепторных пигментов колбочки освещали лучом света

37. Возбудимые мембраны и сенсорные системы

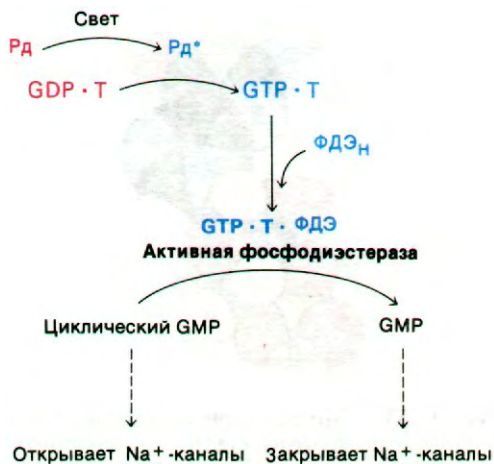


Рис. 37.35. Предполагаемый каскад реакций, регулирующих содержание сGMP в сетчатке глаза. Сокращения: Рд - родопсин, Рд* - фотолизованный родопсин, Т - трансдуцин, ФДЭн - неактивная фосфодиэстераза, ФДЭ - активная фосфодиэстераза.

диаметром 1 мкм (рис. 37.36). Кроме того, во многие колбочки вводили микроэлектроды. Спектры действия, основанные на гиперполяризации плазматических мембран, разделяются на три группы с максимумами соответственно в синей, зеленой и красной областях видимого света. У золотой рыбки максимумы поглощения трех цветовых рецепторов приходятся на 455, 530 и 625 нм, тогда как родопсин характеризуется максимумом 500 нм.

Хромофором в колбочках всех трех типов служит 11-цис-ретиналь. В отсутствие белка протонированное шиффово основание имеет максимум поглощения при 380 нм. Следовательно, различные группировки на опсине оказывают значительное действие на хромофорные свойства связанного 11-цис-ретиналя. Зависимость спектральных свойств этого хромофора от белкового окружения - частное проявление общего принципа, а именно *взаимодействующее влияние на свойства протетической группы*. Другой пример тому - функционирование гема в ка-

честве переносчика кислорода в гемоглобине, переносчика электронов в цитохроме с и катализатора в пероксидазе.

Большинство форм дальтонизма (цветовой слепоты) обусловлено сцепленной с полом рецессивной мутацией. Около 1% мужчин не видят красного цвета, около 2% - зеленого. Как показали спектральные исследования, проведенные на интактном глазе, у этих людей либо совсем отсутствуют фоторецепторные молекулы, воспринимающие красный или зеленый цвет, либо имеется измененный пигмент со сдвинутым спектром поглощения. Таким образом, *дальтонизм обусловлен отсутствием или дефектом одного из типов опсина в колбочках*.

37.19. 11-цис-ретиналь - хромофор всех известных органов зрения

Только у трех типов животных - моллюсков, членистоногих и позвоночных - глаза способны отображать образ предмета. Анатомически глаза этих трех типов устроены совершенно по-разному и, по-видимому, в ходе эволюции возникли независимо. Однако во всех трех случаях хромофором в фоторецепторных молекулах служит 11-цис-ретиналь. *Это поразительный пример конвергентной эволюции*. Что же такого особенного в 11-цис-ретинале? Во-первых, это соединение обладает интенсивной полосой поглощения, которая легко сдвигается в видимую область спектра. Во-вторых, под действием света 11-цис-ретиналь легко изомеризуется. Более того, в темноте скорость изомеризации очень низка. В-третьих, изомеризация вызывает большие изменения в структуре. В итоге поглощенный свет преобразуется в движение атомов такого масштаба, которое способно инициировать генерирование нервного импульса. Наконец, исходными предшественниками

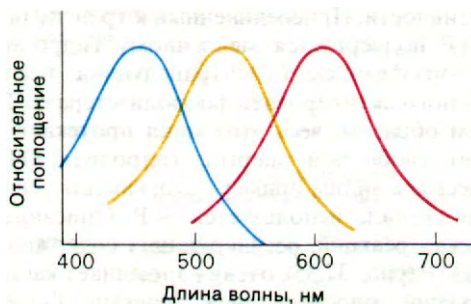


Рис. 37.36. Спектры поглощения трех цветовых рецепторов.

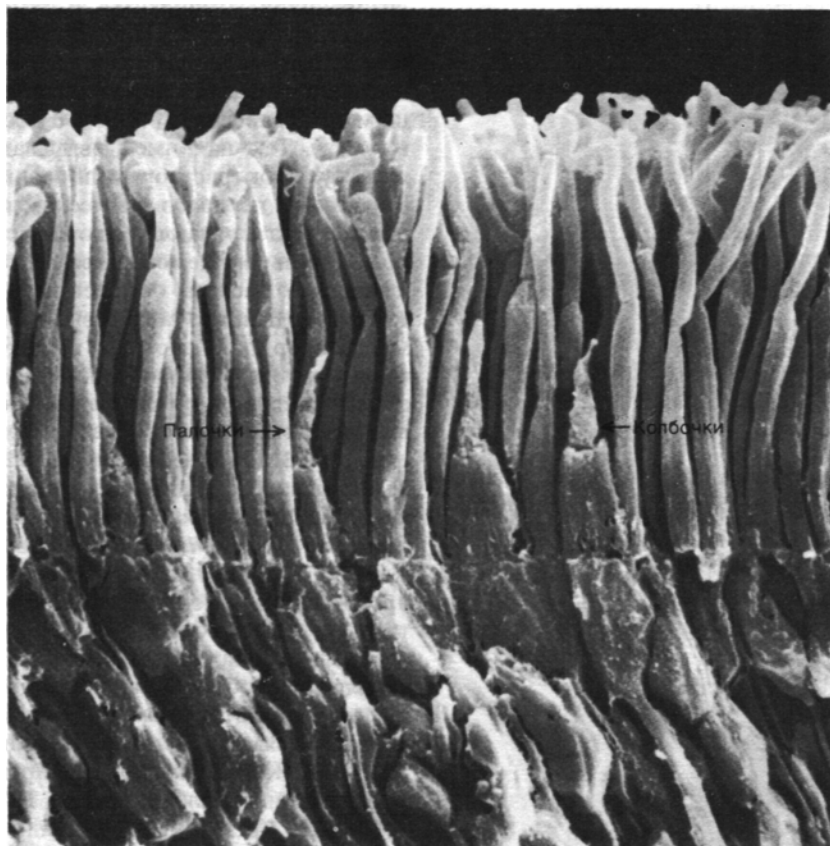


Рис. 37.37. Вид клеток - палочек и колбочек - фоторецепторного слоя сетчатки в сканирующем электронном микроскопе. (Печатается с любезного разрешения д-ра William Miller.)

11-*цис*-ретиная являются каротины (разд. 20.27), очень широко распространенные в живой природе.

37.20. Хеморецепторы бактерий воспринимают специфические молекулы и передают сигналы на жгутики

В конце XIX в. немецкий ботаник Вильгельм Пфедер (Wilhelm Pfeffer) продемонстрировал, что подвижные бактерии скапливаются вокруг отверстия тонкого капилляра, содержащего какой-нибудь аттрактант, например сахар (рис. 37.38). В случае же, когда капилляр содержит репеллент (обычно это вещество, повреждающее бактерии, или продукт их выделения), бактерии движутся прочь от капилляра. Такое направленное движение бактерий в сторону одних веществ и прочь от других называется

хемотаксисом. В 60-х годах Джулиус Адлер (Julius Adler) начал изучать молекулярную основу хемотаксиса бактерий. Выполненные им, а также большим числом других ученых биохимические, генетические и структурные исследования раскрыли многие стороны этого процесса. Хемотаксис начинается с обнаружения химических соединений специфическими *хеморецепторами* на поверхности клетки. Информация от этих сенсоров передается в *систему преобразования*, где происходит анализ и интеграция большого числа стимулов. Далее сенсорная преобразующая система посылает сигналы к *моторам*, приводящим в движение *жгутики*. В зависимости от этих сигналов бактерия либо плавно передвигается по прямой, либо резко меняет направление движения.

У *E. coli* обнаружено около 20 различных хеморецепторов. Каждый из этих белков локализован или в плазматической мембране, или в периплазматическом пространстве. Хеморецептор содержит узнающий и сигна-

37. Возбудимые мембраны и сенсорные системы

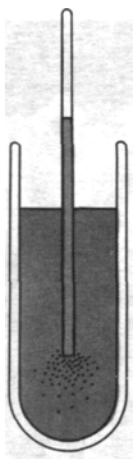


Рис. 37.38. Хемотаксис у бактерий. Бактерии движутся к капилляру, содержащему аттрактант, например глюкозу.

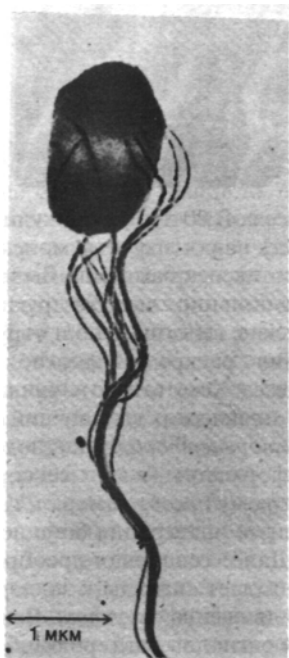


Рис. 37.39. Электронная микрофотография *S. typhimurium*. Хорошо видно, что жгутики собраны в пучок. (Печатается с любезного разрешения д-ра Daniel Koshland.)

лизирующий компоненты. В хеморецепторах, обеспечивающих положительный хемотаксис (привлечение), узнающий компонент оказался связывающим белком, участвующим в транспорте данного соединения в клетку. Так, например, связывающий галактозу белок (растворимый белок, локализованный в периплазматическом пространстве) служит и узнающим компонентом при положительном хемотаксисе на галактозу, и частью насоса, осуществляющего активный транспорт галактозы в клетку. Хеморецептор для глюкозы является также компонентом фосфотрансферазной системы, связанной с мембраной и обеспечивающей активное потребление этого сахара (разд. 36.12). На поверхности *E. coli* имеются хеморецепторы и для таких аттрактантов, как серин, цистеин, аланин, глицин. Хотя транспорт и хемотаксис тесно связаны между собой, однако хемотаксис не зависит от процессов транспорта. Так, некоторые мутанты, неспособные транспортировать определенные сахара или аминокислоты, сохраняют способность направленно двигаться к ним. Имеются также различные хеморецепторы, связанные с отрицательным хемотаксисом. Жирные кислоты, спирты, гидрофобные аминокислоты, индол, H^+ ($pH < 6,5$), OH^- ($pH > 7,5$) и сульфиды отталкивают бактерии путем взаимодействия со специфическими хемосенсорами.

37.21. В основании бактериального жгутика находится вращающий его реверсивный «мотор»

Бактерии плывут благодаря вращению жгутиков, отходящих от поверхности клетки. Эти тонкие спиральные нити состоят из субъединиц массой 53 кДа, называемых *флагеллином*. У бактерии *E. coli* имеется около 6 жгутиков длиной 10 мкм и диаметром 150 Å. Жгутики бактерий по сравнению со жгутиками и ресничками эукариот (разд. 34.18) имеют значительно меньшие размеры и проще устроены. Бактериальный жгутик сам по себе не может совершать активных волнообразных движений, так как в нем нет сократительного аппарата. Его вращает «мотор», расположенный в участке соединения жгутика с клеточной оболочкой. Выделение жгутиков, сохраняющих прикрепленную к ним базальную структуру, позволило изучить эти образования; оказалось, что они состоят из *нити*, *крючка* и *стержня*. У *E. coli* на стержень насажены 4 кольца. Наружное кольцо прикреплено к наруж-

ной мембране, а внутреннее - к плазматической мембране клеточной оболочки. Базальное тельце (рис. 37.40) заякоривает жгутик к клеточной оболочке и приводит его в движение. Этот «мотор» работает за счет протонодвижущей силы, возникающей на плазматической мембране, а не за счет энергии гидролиза АТФ. Действительно, угловая скорость вращения прямо пропорциональна протонодвижущей силе. Загадочное свойство «мотора» состоит в том, что он может вращаться как по часовой стрелке, так и против нее.

Обычно отдельная бактерия *E. coli* спокойно плавает по прямой примерно одну секунду. За это время она проходит расстояние около 30 мкм, что примерно в 15 раз превышает ее собственную длину. Затем бактерия как бы кувыркается и резко меняет направление движения (рис. 37.41). Угол поворота в среднем обычно составляет 60°. От чего зависит, движется ли бактерия плавно или кувыркаясь? Оказалось, что при вращении жгутиков против часовой стрелки их спиральные нити организуются в стройный пучок, который и обеспечивает плавное передвижение клетки. Если же жгутики вращаются по часовой стрелке, то весь пучок рассыпается, каждая нить тянет в свою сторону и бактерия начинает кувыркаться.

37.22. Бактерии различают временной градиент, а не одномоментный пространственный градиент концентраций
Регуляция частоты кувыркания занимает центральное место в хемотаксисе. Когда бактерия движется в направлении увеличения концентрации аттрактанта, кувыркание становится реже. Наоборот, при движении от аттрактанта бактерия кувыркается чаще. Репелленты оказывают противоположный эффект на частоту кувыркания бактерий. В результате при движении в сторону аттрактанта или прочь от репеллента бактерия плавает прямолинейно в течение большего промежутка времени, чем при движении в противоположном направлении. Кувыркание способствует выбору правильного направления.

Сравнивает ли бактерия концентрации аттрактанта на двух концах своей клетки, или же она сравнивает концентрации аттрактанта в два отдельных момента времени? Другими словами, является ли ее сенсорный механизм пространственным или временным? Дэниел Кошланд и Роберт Макнаб (Daniel Koshland, Robert

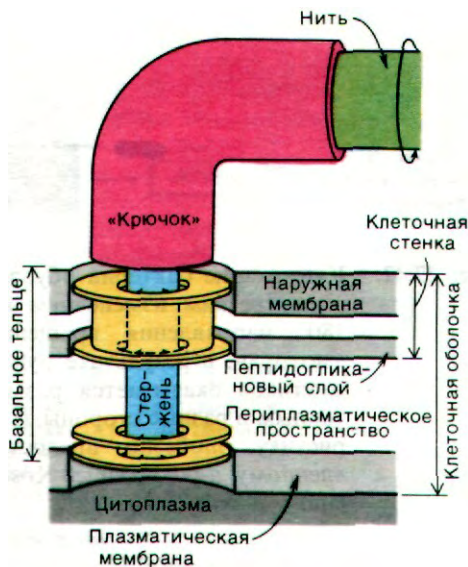


Рис. 37.40. Базальное тельце жгутика у *E. coli*. (Adler J., The sensing of chemicals by bacteria, 1976.)

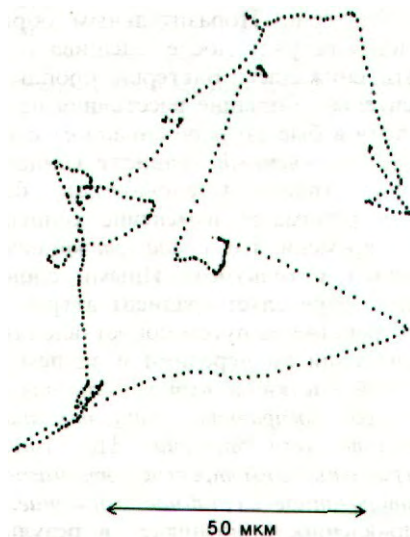


Рис. 37.41. Проекция пути *E. coli*, полученная в электронном микроскопе путем автоматического слежения за перемещением бактерии в трех измерениях. Точки отделены друг от друга промежутком 80 мс. [Berg H.C., Nature, 254, 390 (1975).]

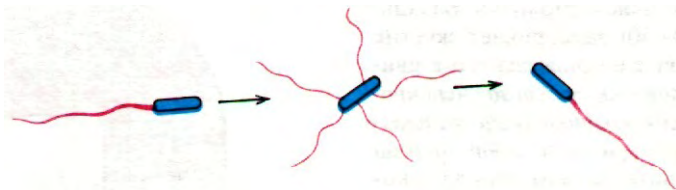


Рис. 37.42. Кувыркание бактерии обусловлено резким изменением на 180° направления вращения «мотора»; в результате пучок жгутиков оказывается разметанным в разные стороны. (По рисунку, любезно предоставленному д-ром Daniel Koshland.)

Маснаб) нашли ответ на этот важный вопрос, поставив очень простой и остроумный опыт. Суспензию бактерий в среде, лишенной аттрактанта, быстро смешивали с раствором, содержащим аттрактант, и подсчитывали частоту кувырканий бактерий. Поразительным образом уже через секунду после смешивания эта частота снижалась. Бактерии проплывали относительно большие расстояния по прямой, хотя в быстро перемешанном растворе пространственный градиент концентрации отсутствовал. Следовательно, бактерии воспринимают изменение концентрации во времени, т.е. *обладают временным сенсорным механизмом*. Иными словами, бактерия определяет градиент аттрактанта в пространстве не путем сопоставления его концентрации на переднем и заднем концах своей клетки, а путем сопоставления отдельных восприятий концентрации во времени по мере движения. По существу, бактериальный хемотаксис - это частично ориентированное случайное движение. Целенаправленность возникает в результате отбора случайных направлений движения.

37.23. При бактериальном хемотаксисе передача информации обеспечивается метилированными белками

Реакция бактерии на тот или иной градиент концентрации аттрактанта не является строго определенной. Торможение кувыркания, обусловленное повыше-

нием концентрации аттрактанта, является временным. После определенного лаг-периода частота кувырканий возвращается к исходному уровню. По существу, при постоянном наличии аттрактанта бактерия теряет чувствительность к нему. Благодаря такой десенсибилизации, называемой *адаптацией*, бактерии способны воспринимать градиенты в широком диапазоне концентраций аттрактанта. Как указывалось ранее, аналогичным свойством обладает реакция палочек сетчатки на свет (рис. 37.30).

Генетические исследования хемотаксиса бактерий показали, что информация по крайней мере от 12 хеморецепторов передается через 3 белка-продукта генов *tsr*, *tar* и *trg* (рис. 37.43). Например, сигналы от рецепторов рибозы и галактозы поступают на белок *trg*. Указанные три белка подвергаются обратимому метилированию, и потому их называют *метил-акцепторные хемотаксические белки (МХБ)*. Несколько глутаматных боковых цепей в каждом из этих белков подвергается метилированию под действием метилтрансферазы, использующей S-аденозилметионин в качестве активированного донора метильных групп (рис. 37.44). Эти ковалентные модификации могут быть обращены специфической эстеразой. Уровень метилирования МХБ возрастает при воздействии аттрактантом и снижается при воздействии репеллентом. По-видимому, адаптация опосредована степенью метилирования этих белков.

Информация от указанных трех метил-акцепторных белков попадает далее на продукты генов *che*. Каким образом эти молекулы определяют направление вращения жгутиков, остается неизвестным. Однако теперь уже совершенно ясно, что у бактерий имеется примитивная сенсорная система, образованная продуктами примерно 30 генов, в которой обрабатывается и интегрируется информация относительно питательных веществ и ядов в окружающей бактерию среде. В сущности, основной вопрос для бактерии: «кувыркаться или не кувыркаться»?

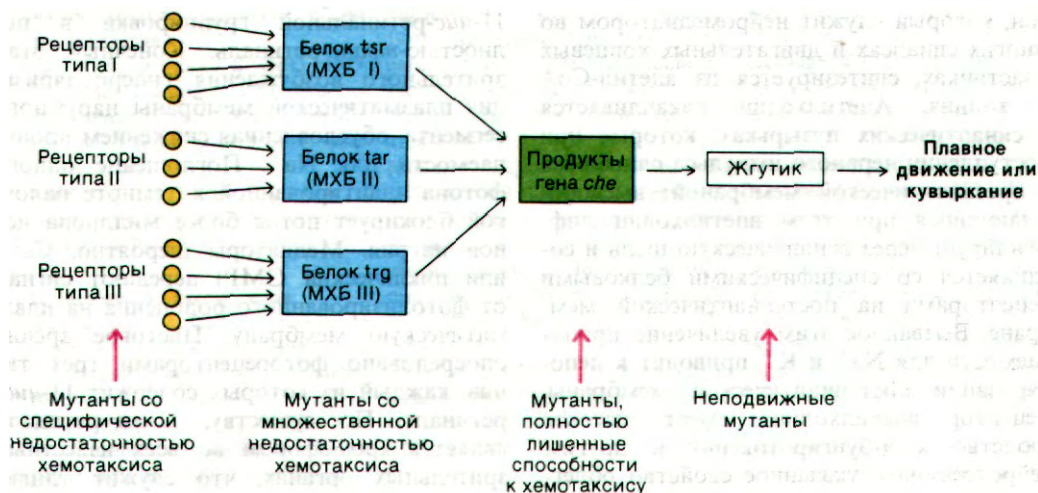


Рис. 37.43. Путь передачи информации при хемотаксисе бактерий. В нижней части схемы показаны выявленные типы мутантов. МХБ - акцептирующий метильную группу хемотаксический белок. [Springer R. S., Coy M.F., Adler J., Nature, 280, 280 (1979).]

Заключение

Потенциалы действия в мембранах аксонов нервных клеток опосредованы кратковременным изменением проницаемости для Na^+ и K^+ . И Na^+ , и K^+ -каналы регулируются трансмембранной разностью потенциалов. Тетродотоксин и сакситоксин - специфические блокаторы Na^+ -каналов. Передача нервных импульсов через синапсы в большинстве случаев опосредована химическими медиаторами. Ацетилхо-

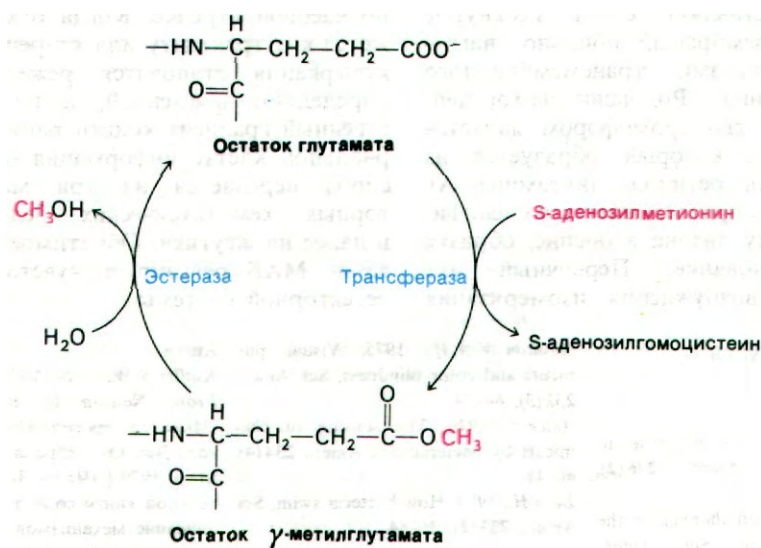


Рис. 37.44. Обратимое метилирование метил-акцепторных хемотаксических белков.

лин, который служит нейромедиатором во многих синапсах и двигательных концевых пластинках, синтезируется из ацетил-СоА и холина. Ацетилхолин накапливается в синаптических пузырьках, которые при поступлении нервного импульса сливаются с пресинаптической мембраной; высвобождающийся при этом ацетилхолин диффундирует через синаптическую щель и соединяется со специфическими белковыми рецепторами на постсинаптической мембране. Вызванное этим увеличение проницаемости для Na^+ и K^+ приводит к деполяризации постсинаптической мембраны. Рецептор ацетилхолина имеет высокое сродство к α -бунгаротоксину и другим нейротоксинам; указанное свойство облегчило выделение и очистку этого интегрального мембранного белка. После гидролиза ацетилхолина под действием ацетилхолинэстеразы происходит реполяризация постсинаптической мембраны. Ингибиторами ацетилхолинэстеразы служат органические фосфаты, в частности ДИФФ, который может вызвать смерть вследствие паралича дыхания. К числу нейромедиаторов относятся также катехоламины (адреналин, норадреналин и дофамин) и γ -аминобутират (ГАМК).

Возбуждение палочек сетчаткой глаза может быть вызвано одним фотоном. В наружном сегменте палочки имеется около тысячи уложенных пачкой дисков, которые представляют собой замкнутые двуслойные мембраны, обильно нагруженные молекулами трансмембранного белка родопсина. Родопсин - фоторецепторный белок; его хромофором является 11-*цис*-ретиаль, который образуется из полностью-*транс*-ретинола (витамина А). 11-*цис*-ретиаль присоединяется к специфическому остатку лизина в опсине, образуя шиффово основание. Первичный акт зрительного возбуждения - изомеризация

11-*цис*-ретиальной группировки в полностью-*транс*-ретиаль. Конечный этап зрительного возбуждения - гиперполяризация плазматической мембраны наружного сегмента, обусловленная снижением проницаемости для Na^+ . Поглощение одного фотона адаптированной к темноте палочкой блокирует поток более миллиона ионов натрия. Медиаторы (вероятно, Ca^{2+} или циклический GMP) передают сигнал от фотолизованного родопсина на плазматическую мембрану. Цветовое зрение опосредовано фоторецепторами трех типов, каждый из которых содержит 11-*цис*-ретиаль. По существу, 11-*цис*-ретиаль является хромофором во всех известных зрительных органах, что служит удивительным примером конвергентной эволюции.

Подвижные бактерии способны к направленному движению в сторону аттрактанта (например, глюкозы) или от репеллента (например, жирных кислот). Сенсоры для хемотаксиса локализованы в периплазматическом пространстве или на плазматической мембране. Бактериальные жгутики вращаются с помощью «моторов», использующих энергию протонного градиента на плазматической мембране. Бактерии спокойно плывут в течение примерно секунды, затем кувыркаются вследствие перемены направления вращения жгутиков от движения против часовой стрелки к движению по часовой стрелке. Когда бактерия движется к аттрактанту или от репеллента, ее кувыркания становятся реже. Бактерии определяют временной, а не пространственный градиент концентрации. В бактериальной клетке информация от хемосенсоров передается на три метил-акцепторных хемотаксических белка (МХБ) и далее на жгутики. Обратимое метилирование МХБ регулирует чувствительность детекторной системы.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

С чего начать

- Lester H.A., 1977. The response to acetylcholine, Sci. Amer., 236 (2), 106-118.
 Keynes R.D., 1979. Ion channels in the nerve-cell membrane, Sci. Amer., 240(3), 126-135.

- Rushton W.A.H., 1975. Visual pigments and color blindness, Sci. Amer., 232(3), 64-74.
 Adler J., 1976. The sensing of chemicals by bacteria, Sci. Amer., 234(4), 40-47.
 Berg H., 1975. How bacteria swim, Sci. Amer., 233(2), 36-44.

Книги

- Kuffler S.W., Nicholls J.G., 1976. From Neuron to Brain, Sinauer. [Имеется перевод: Куфлер С., Николс Дж. От нейрона к мозгу.- М.: Мир, 1979.] (Часть II этой замечательной книги содержит прекрасное описание механизмов передачи сигналов по нейронам.)
 Katz B., 1966. Nerve, Muscle, and Synapse, McGraw-Hill. [Имеется перевод: Катц Б. Нерв, мышца и синапс.- М.: Мир, 1968.] (Велико-

лепное краткое изложение общих представлений.)

Cone R.A., Dowling J.E. (eds.), 1979. Membrane Transduction Mechanisms, Raven Press. (Сжатые и ясные описания различных возбудимых мембранных систем.)

Aidley D.J., 1977. The Physiology of Excitable Cells (2nd ed.), Liverpool University Press.

Проведение по аксону нерва

Hille B., 1978. Ionic channels in excitable membranes: current problems and biophysical approaches, Biophys. J., 22, 283-294.

Barchi R.L., Cohen S.A., Murphy L.E., 1980. Purification from rat sarcolemma of the saxitoxin-binding component of the excitable membrane sodium channel, Proc. Nat. Acad. Sci., 77, 1306-1310.

Morell P., Norton W.T., 1980. Myelin. Sci. Amer., 242(5), 88-118.

Ritchie J.M., Rogart R.B., 1977. Density of sodium channels in mammalian myelinated nerve fibers and nature of the axonal membrane under the myelin sheath, Proc. Nat. Acad. Sci., 74, 211-215.

Синаптическая передача

Axelrod J., 1974. Neurotransmitters, Sci. Amer. 230(6), 59-71.

Heidmann T., Changeux J.-P., 1978. Structural and functional properties of the acetylcholine receptor protein in its purified and membrane-bound states, Ann. Rev. Biochem., 47, 317-357.

Rafferty M.A., Hunkapiller M.W., Strader C.D., Hood L.E., 1980. Acetylcholine receptor: complex of homologous subunits, Science, 208, 1454-1457.

Klymkowsky M.W., Stroud R.M., 1979. Immunospecific identification and three-dimensional structure of a membrane-bound acetylcholine receptor from *Torpedo California*, J. Mol. Biol., 128, 319-334.

Moore H.H., Hartig P.R., Rafferty M. A., 1979. Correlation of polypeptide composition with functional events in acetylcholine receptor-enriched membranes from *Torpedo California*, Proc. Nat. Acad. Sci., 76, 6265-6269.

Fulpius B.W., Miskin R., Reich E., 1980. Antibodies from myasthenic patients that compete with cholinergic agents for binding to nicotinic receptors, Proc. Nat. Acad. Sci., 77, 4326-4330.

Hess G.P., Lipkowitz S., Struve G.E., 1978. Acetylcholine-receptor mediated ion flux in electroplax membrane microsacs (vesicles): change in mechanism produced by asymmetrical distribution of sodium and potassium ions, Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 1703-1707.

Anglister L., Silman L., 1978. Molecular structure of elongated forms of electric eel acetylcholinesterase, J. Mol. Biol. 125, 293-311.

Зрение

Miller W.H., (ed.), 1981. Molecular Mechanisms of Photoreceptor Transduction, Academic Press.

Hagins W.A., 1979. Excitation in vertebrate photoreceptors. In: Schmitt F.O. and Worden F.G. (eds.), The Neurosciences: Fourth Study Program, pp. 183-191, MIT Press.

Hubbell W.L., Bownds M.D., 1979. Visual transduction in vertebrate photoreceptors, Ann. Rev. Neurosci., 2, 17-34.

Wald G., 1968. The molecular basis of visual excitation, Nature, 219, 800-807. (Нобелевская лекция; содержит интересное описание того, как был открыт первичный акт зрительного возбуждения.)

Young R.W., 1970. Visual cells, Sci. Amer., 223(4), 80-91.

Dawling J.E., 1966. Night blindness, Sci. Amer., 215(4), 78-84.

MacNichol E.F., Jr., 1964. Three-pigment color vision, Sci. Amer., 211(6), 48-56.

Yoshikami S., George J.S., Hagins W.-A., 1980. Light-induced calcium fluxes from outer segment layer of vertebrate retinas, Nature, 286, 395-398.

Pober J.S., Bitensky M.W., 1979. Light-regulated enzymes of vertebrate retinal rods, Advan. Cyclic Nucleotide Res., 11, 265-301.

Liebman P.A., Pugh E.N., Jr., 1979. The control of phosphodiesterase in rod disk membranes: kinetics, possible mechanisms, and significance for vision, Vision Res., 19, 375-380.

Fung B.K.-K., Stryer L., 1980. Photolyzed rhodopsin catalyzes the exchange of GTP for bound GDP in retinal rod outer segments, Proc. Nat. Acad. Sci., 77, 2500-2504.

Хемотаксис

Koshland D.E., Jr., 1979. A model regulatory system: bacterial chemotaxis, Physiol. Rev., 59, 811-862.

Macnab R., Koshland D.E., Jr., 1972. The gradient-sensing mechanism in bacterial chemotaxis, Proc. Nat. Acad. Sci., 69, 2509-2512. (Эти опыты показали, что бактерии определяют временной, а не пространственный градиент.)

Springer M.S., Goy M.F., Adler J., 1979. Protein methylation in behavioural control mechanisms and in signal transduction, Nature, 280, 279-284.

Silverman M.R., Simon M.I., 1974. Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility, Nature, 249, 73-74.

Manson M.D., Tedesco P., Berg C., Harold F.M., van der Drift C., 1977. A protomotive force drives bacterial flagella, Proc. Nat. Acad. Sci., 74, 3060-3064.

Manson M.D., Tedesco P.M., Berg H.C., 1980. Energetics of flagellar rotation in bacteria, J. Mol. Biol., 138, 541-561.

Khan S., Macnab R.M., 1980. Proton chemical potential, proton electrical potential and bacterial motility, J. Mol. Biol., 138, 599-614.

Stock J.B., Koshland D.E., Jr., 1978. A protein methyltransferase involved in bacterial sensing, Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 3659-3663.

Kondoh H., Ball C.B., Adler J., 1979. Identification of a methyl-accepting chemotaxis protein for the ribose and galactose chemoreceptors of *Escherichia coli*, Proc. Nat. Acad. Sci., 76, 260-264.

Berg H.C., Purcell E.M., 1977. Physics of chemoreception, Biophys. J., 20, 193-219.

Ответы на вопросы и задачи

Глава 24

- а) TTGATC; б) GTTCGA; в) ACGCGT; г) ATGGTA.
- а) $[T] + [C] = 0,46$.
б) $[T] = 0,30$; $[C] = 0,24$; $[A] + [G] = 0,46$.
- $5,88 \cdot 10^3$ пар оснований.
- Через 1,0 генерацию половина молекул будет $^{15}\text{N}-^{15}\text{N}$, а другая половина $^{14}\text{N}-^{14}\text{N}$. Через 2,0 поколения четверть всех молекул будет $^{15}\text{N}-^{15}\text{N}$, остальные три четверти $^{14}\text{N}-^{14}\text{N}$. Гибридные молекулы $^{14}\text{N}-^{15}\text{N}$ при консервативной репликации обнаруживаться не будут.
- FAD, CoA, NADP⁺.
- ДНК-лигаза релаксирует сверхспирализованную ДНК, катализируя расщепление фосфодиэфирной связи в одной из цепей ДНК. Атакующая группа - AMP; она присоединяется к 5'-фосфорильной группе в месте расщепления. AMP необходим потому, что эта реакция представляет собой обращение заключительной стадии соединения различных кусков ДНК (см. рис. 24.32 в разд. 24.15).
- 5'-GGCATAC-3'.

Глава 25

- а) ДНК-полимераза I представляет собой одну-единственную полипептидную цепь, а РНК-полимераза имеет субъединичную структуру $\alpha\beta\beta'$.
б) Предшественниками служат дезоксинуклеозидтрифосфаты, а не рибонуклеозидтрифосфаты.
в) Направление синтеза для обоих ферментов 5'→3'.
г) ДНК-полимераза I обладает 5'→3'- и 3'→5'-экзонуклеазными активностями, а РНК-полимераза - ни одной из них.
д) ДНК-полимераза I осуществляет полуконсервативный синтез, а РНК-полимераза - консервативный.
е) ДНК-полимеразе I необходима затравка, а РНК-полимеразе нет.

ж) Движущей силой обеих реакций является гидролиз пирофосфата.

- 5'-UAACGGUACGAU-3'.
- 2'-ОН группа в составе РНК действует в качестве внутримолекулярного катализатора. При щелочном гидролизе РНК образуется 2'3'-циклический промежуточный продукт. Кордицепин обрывает синтез РНК. В цепи РНК, содержащей кордицепин, нет 3'-ОН-группы.
- а) pGp, AGUp, ACp, Up, GUp и C.
б) pGp, CAGp, UACUp и UC
в) pGp, CAp, Gp, UAp, CUGp и UC.
г) pGp, CAp, Gp, Up, Ap, CUp и C.
- UAGCCUGAAUp.

Глава 26

- Leu-Pro-Ser-Asp-Trp-Met-.
- Poly (Leu-Leu-Thr-Tyr).
- а) Pro (CCC), Ser (UCC), Leu (CUC) и Phe (UUC). В другом случае последнее основание каждого из этих кодонов может быть U.
б) Эти C → U- мутации были вызваны азотистой кислотой.
- а) Для этого понадобились бы две замены оснований.
б) Arg, Asn, Gln, Gln, Ile, Met или Thr.
- а) Нет, эта последовательность возникла в результате делеции первого основания приведенной ниже последовательности и вставки другого основания в конце.
б) —AGUCCAUCACUUAU—.
- Они имеют следующие последовательности: Lys-стоп; -Met-Arg-; -Asn-Gln-.

Глава 27

- а) Нет; б) нет; в) да.
- В градиенте будет 4 полосы: легкая; тяжелая; полоса, соответствующая гибриду легкой 30S и тяжелой 50S-субчастиц; полоса, соответствующая гибриду тяжелой 30S- и легкой 50S-субчастиц.
- Расходуется примерно 799 богатых энергией фосфатных связей: 400 для активирования 200 аминокислот, 1 для инициации и 398 для образования 199 пептидных связей.
- б), в) и е) - механизм 1-го типа; а), г) и д) - механизм 2-го типа.

5. Простейшее предположение состоит в том, что антикодон ССА триптофановой тРНК мутировал в UCA-кодон, комплементарный UGA. Однако изучение этой измененной тРНК привело к неожиданному результату. Ее антикодон остался неизменным. Вместо этого произошло замещение А на Г в положении 24. Таким образом, остаток, расположенный на значительном расстоянии от антикодона в линейной последовательности, может влиять на точность узнавания кодона.
 6. Один из подходов состоит в том, чтобы синтезировать тРНК, к которой присоединен реакционноспособный аналог аминокислоты. Например, бромацетилфенилаланил-тРНК служит реагентом для мечения по сродству Р-участка рибосом *E.coli*. См. статью: Oen H., Pellegrini M., Eilat D., Cantor C. R., Proc. Nat. Acad. Sci., 70, 2799 (1973).
 7. Последовательность GAGGU комплементарна последовательности пяти оснований на 3'-конце 16S-рРНК и расположена на расстоянии нескольких оснований в 5'-сторону от кодона AUG. Поэтому этот участок служит сигналом начала синтеза белка. Замещение Г на А могло бы ослаблять взаимодействие этой мРНК с 16S-рРНК и снижать таким образом эффективность этой последовательности в качестве сигнала инициации. Действительно, эта мутация приводит к 10-кратному снижению скорости синтеза белка, кодируемого мРНК. См. статью, в которой подробнее обсуждаются свойства этой интересной мутации: Dunn J. J., Buzash-Pollert E., Studier F. W., Proc. Nat. Acad. Sci., 75, 2741 (1978).
 8. В обоих случаях используются реакции гидролиза: 3'—>5'-экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы I и гидролиз ошибочного промежуточного продукта аминоксил—АМР под действием аминоксил-тРНК—синтетазы.
2. Одна из возможностей состоит в том, что в i^s -мутанте образуется измененный *lac*-репрессор, который почти не имеет сродства к индуктору, но проявляет нормальное сродство к оператору. Такой *lac*-репрессор будет связываться с оператором и блокировать транскрипцию даже в присутствии индуктора.
 3. У этого мутанта *lac*-оператор изменен таким образом, что он не может связывать репрессор. Такая мутация обозначается O^c (от англ. operator constitutive - конститутивный оператор).
 4. У этого мутанта, видимо, белок, связывающий циклический АМР (БАК), либо имеет измененную структуру (дефектен), либо совсем отсутствует.
 5. Клетка *E. coli*, несущая профаг λ , содержит молекулы λ -репрессора, которые также блокируют транскрипцию предранних генов других частиц фага λ .
 6. а) Трансляция транскрипта P_{RE} происходит в 5-10 раз быстрее, чем трансляция транскрипта P_{RM} , так как он содержит полноценный сигнал инициации синтеза белка (как это обсуждается в разд. 27.14).
б) Более эффективная трансляция транскрипта P_{RE} приводит к быстрому образованию большого количества молекул λ -репрессора, необходимых для установления лизогенного состояния. Обсуждение этого процесса см. в статье: Ptashe M., Backman K., Humagun Z., Jeffrey A., Maurer R., Meyer B., Sauer R.T., Science, 194, 156 (1976).

Глава 28

1. а) у i^- -мутанта нет *lac*-репрессора. Поэтому такой мутант конститутивен в отношении синтеза белков *lac*-оперона.
б) Этот мутант конститутивен в отношении

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Физические константы
и перевод единиц
из одной системы
в другую

Числовые значения физических констант

Величина	Символ	Значение ¹
Атомная единица массы (далтон)	а.е.м. (Да)	$1,66 \cdot 10^{-24}$ г
Число Авогадро	N	$6,022 \cdot 10^{23}$ моль ⁻¹
Постоянная Больцмана	k	$1,381 \cdot 10^{-23}$ Дж • К ⁻¹ $3,298 \cdot 10^{-24}$ кал • К ⁻¹
Электрон-вольт	эВ	$1,602 \cdot 10^{-19}$ Дж $3,828 \cdot 10^{-20}$ кал
Число Фарадея	F	$9,649 \cdot 10^4$ Кл • моль ⁻¹ $2,306 \cdot 10^4$ кал • В ⁻¹ • экв ⁻¹
Радиоактивность	Ки	$3,70 \cdot 10^{10}$ расп • с ⁻¹
Универсальная газовая постоянная	R	$8,314 \cdot$ Дж • моль ⁻¹ • К ⁻¹ $1,987$ кал • моль ⁻¹ • К ⁻¹
Постоянная Планка	h	$6,626 \cdot 10^{-34}$ Дж • с $1,584 \cdot 10^{-34}$ кал • с
Скорость света в вакууме	c	$2,998 \cdot 10^{10}$ см • с ⁻¹

¹ Используемые сокращения: В - вольт; г - грамм; Дж - джоуль; К - кельвин; кал - калория; Кл - кулон; с - секунда; см - сантиметр; экв - эквивалент.

Математические постоянные

$n = 3,14159$
 $e = 2,71828$
 $\ln x = 2,303 \lg x$

Соотношение единиц измерения

Физические величины	Единицы измерения
Длина	1 см = 10^{-2} м = 10 мм = 10^4 мкм = 10^7 нм = 10^8 А = 0,3937 дюйма
Масса	1 г = 10^{-3} кг = 10^3 мг = 10^6 мкг = $3,527 \cdot 10^{-2}$ унций
Объем	1 см ³ = 10^{-6} м ³ = 10^3 мм ³ 1 мл = 1 см ³ = 10^{-3} л = 10^3 мкл 1 см ³ = $6,1 \cdot 10^{-2}$ дюйм ³ = $3,53 \cdot 10^{-5}$ фут ³
Температура	К = °С + 273,15 °С = 5/9 (°F - 32)
Энергия	1 Дж = 10^7 эрг = 0,239 кал = 1 Вт • с
Давление	1 торр = 1 мм рт. ст. (0°С) = $1,333 \cdot 10^2$ Н/м ² = $1,333 \cdot 10^2$ Па = $1,316 \cdot 10^{-3}$ атм

Приставки для образования кратных и дольных единиц измерений

Приставка	Обозначение		Численный эквивалент приставки
	русскими буквами	латинскими или греческими буквами	
Кило	к	k	10^3
Гекто	г	h	10^2
Дека	да	da	10^1
Деци	д	d	10^{-1}
Санتي	с	c	10^{-2}
Милли	М	m	10^{-3}
Микро	мк	μ	10^{-6}
Нано	н	n	10^{-9}
Пико	п	p	10^{-12}

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Порядковые номера и атомные массы элементов

Название	Знак	Поряд- ковый номер	Атомная масса	Название	Знак	Поряд- ковый номер	Атомная масса
Азот	N	7	14,01	Кремний	Si	14	28,09
Актиний	Ac	89	227,03	Криптон	Kr	36	83,80
Алюминий	Al	13	26,98	Ксенон	Xe	54	131,30
Америций	Am	95	243,06	Курчатовий	Kh	104	260
Аргон	Ar	18	39,95	Кюрий	Cm	96	245,07
Астат	At	85	210,99	Лантан	La	57	138,91
Барий	Ba	56	137,34	Литий	Li	3	6,94
Бериллий	Be	4	9,01	Лоуренсий	Lr	103	256
Берклий	Bk	97	247,07	Лютеций	Lu	71	174,97
Бор	B	5	10,81	Магний	Mg	12	24,31
Бром	Br	35	79,90	Марганец	Mn	25	54,94
Ванадий	V	23	50,94	Медь	Cu	29	63,55
Висмут	Bi	83	208,97	Менделевий	Md	101	255,09
Водород	H	1	1,01	Молибден	Mo	42	95,94
Вольфрам	W	74	183,85	Мышьяк	As	33	74,92
Гадолиний	Gd	64	157,25	Натрий	Na	11	22,99
Галлий	Ga	31	69,72	Неодим	Nd	60	144,24
Гафний	Hf	72	178,49	Неон	Ne	10	20,18
Гелий	He	2	4,00	Нептуний	Np	93	237,05
Германий	Ge	32	72,59	Никель	Ni	28	58,71
Гольмий	Ho	67	164,93	Ниобий	Nb	41	92,91
Диспрозий	Dy	66	162,50	Нобелий	No	102	255
Европий	Eu	63	151,96	Олово	Sn	50	118,69
Железо	Fe	26	55,85	Осмий	Os	76	190,20
Золото	Au	79	196,97	Палладий	Pd	46	106,40
Индий	In	49	114,82	Платина	Pt	78	195,09
Иод	I	53	126,90	Плутоний	Pu	94	242,06
Иридий	Ir	77	192,22	Полоний	Po	84	208,98
Иттербий	Yb	70	173,04	Празеодим	Pr	59	140,91
Иттрий	Y	39	88,91	Прометий	Pm	61	145
Кадмий	Cd	48	112,40	Протактиний	Pa	91	231,04
Калий	K	19	39,10	Радий	Ra	88	226,03
Калифорний	Cf	98	249,07	Радон	Rn	86	222,02
Кальций	Ca	20	40,08	Рений	Re	75	186,20
Кислород	O	8	16,00				
Кобальт	Co	27	58,93				

Название	Знак	П о р я д - ковый номер	Атомная масса	Название	Знак	П о р я д - ковый номер	Атомная масса
Родий	Rh	45	102,91	Титан	Ti	22	47,90
Ртуть	Hg	80	200,59	Торий	Th	90	232,04
Рубидий	Rb	37	85,47	Туллий	Tm	69	168,93
Рутений	Ru	44	101,07	Углерод	C	6	12,01
Самарий	Sm	62	150,40	Уран	U	92	238,03
Свинец	Pb	82	207,20	Фермий	Fm	100	257,08
Селен	Se	34	78,96	Фосфор	P	15	30,97
Сера	S	16	32,06	Франций	Fr	87	223,02
Серебро	Ag	47	107,87	Фтор	F	9	18,99
Скандий	Sc	21	44,96	Хлор	Cl	17	35,45
Стронций	Sr	38	87,62	Хром	Cr	24	52,00
Сурьма	Sb	51	121,75	Цезий	Cs	55	132,91
Таллий	Tl	81	204,37	Церий	Ce	58	140,12
Тантал	Ta	73	180,95	Цинк	Zn	30	65,37
Теллур	Te	52	127,60	Цирконий	Zr	40	91,22
Тербий	Tb	65	158,93	Эйнштейний	Es	99	254,09
Технеций	Tc	43	98.91	Эрбий	Er	68	167,26

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Значение рК' для ряда кислот

Кислота	<i>pK'</i> (при 25°С)	Кислота	<i>pK'</i> (при 25°С)
Аммония ион	9,25		
Аскорбиновая, <i>pK'₁</i> <i>pK'₂</i>	4,10 11,79		
Ацетоуксусная	3,58		
Бензойная	4,20	Пиридиния ион	5,25
Вода	14,0	Пирофосфорная, <i>pK'₁</i>	0,85
		<i>pK'₂</i>	1,49
Глицин, <i>pK'₁</i> <i>pK'₂</i>	2,35 9,78	<i>pK'₃</i>	5,77
Имидазолия ион	6,95	<i>pK'₄</i>	8,22
Какодиловая	6,19	Триметиламмон- ния ион	9,79
Лимонная, <i>pK'₁</i> <i>pK'₂</i> <i>pK'₃</i>	3,14 4,77 6,39	Трис(гидроксиме- тил)-аминометан	8,08
Малеиновая, <i>pK'₁</i> <i>pK'₂</i>	1,83 6,07	Угольная, <i>pK'₁</i>	6,35
n-Масляная	4,81	<i>pK'₂</i>	10,33
Молочная	3,86	Уксусная	4,76
Муравьиная	3,75	Фенол	9,89
		Фосфорная, <i>pK'₁</i>	2,12
		<i>pK'₂</i>	7,21
		<i>pK'₃</i>	12,67
		Этиламмония ион	10,81
		Яблочная, <i>pK'₁</i>	3,40
		<i>pK'₂</i>	5,11
		Янтарная, <i>pK'₁</i>	4,21
		<i>pK'₂</i>	5,64

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Стандартные длины связей

Связь	Структура	Длина, А
C—H	R ₂ CH ₂	1,07
	Ароматическая RCH ₃	1,08 1,10
C—C	Углеводородная	1,54
	Ароматическая	1,40
C=C	Этилен	1,33
C≡C	Ацетилен	1,20
C—N	RNH ₂	1,47
	O=C—N	1,34
C—O	Спирт	1,43
	Эфир	1,36
C=O	Альдегид	1,22
	Амид	1,24
C—S	R ₂ S	1,82
N—H	Амид	0,99
O—H	Спирт	0,97
O—O	O ₂	1,21
P—O	Эфир	1,56
S—H	Тиол	1,33
S—S	Дисульфид	2,05

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Стандартные сокращения, принятые в биохимии

АКТГ (АСТН)	адренокортикотропный гормон	cDNA (кДНК)	комплементарная ДНК
АПБ (АСР)	ацилпереносящий белок	DNase (ДНКаза)	дезоксирибонуклеаза
АТРаза	аденозинтрифосфатаза	DNP (ДНФ)	динитрофенол
ДИФФ (DIPF)	диизопропилфторфосфат	DPN ⁺	см. NAD ⁺
ДНК (DNA)	дезоксирибонуклеиновая кислота	DPNH	см. NADH
кДНК	комплементарная ДНК	FAD	флавинадениндинуклеотид (окис- ленная форма)
ДНКаза (DNase)	дезоксирибонуклеаза	FADH ₂	флавинадениндинуклеотид (вос- становленная форма)
ДНФ (DNP)	динитрофенол	fMet	формилметионин
РНК (RNA)	рибонуклеиновая кислота	FMN	флавиномононуклеотид (окислен- ная форма)
мРНК (mRNA)	информационная (матричная) РНК	FMNH ₂	флавиномононуклеотид (восста- новленная форма)
рРНК (rRNA)	рибосомная РНК	G	гуанин
тРНК (tRNA)	транспортная РНК	GDP	гуанозиндифосфат
РНКаза (RNase)	рибонуклеаза	Gln	глутамин
А	аденин	Glu	глутамат
АСР (АПБ)	ацил переносящий белок	Gly	глицин
АСТН (АКТГ)	адренокортикотропный гормон	GMP	гуанозинмонофосфат
ADP	а денозиндифосфат	GTP	гуанозинтрифосфат
Ala	аланин	Hb	гемоглобин
AMP	аденозинмонофосфат	HbCO	карбоксигемоглобин
cAMP	циклический АМР	HbO ₂	оксигемоглобин
Arg	аргинин	His	гистидин
Asn	аспарагин	Hyp	гидроксипролин
Asp	аспартат	IgG	иммуноглобин G
АТР	аденозинтрифосфат	Ile	изолейцин
АТРаза	аденозинтрифосфатаза	ITP	инозинтрифосфат
С	цитозин	Leu	лейцин
CDP	цитидиндифосфат	Lys	лизин
СМР	цитидинмонофосфат	Mb	миоглобин
СТР	цитидинтрифосфат	MbO ₂	оксимиоглобин
CoA	кофермент А	Met	метионин
CoQ	кофермент Q (убихинон)	MetHb	метгемоглобин
Cys	цистеин	NAD ⁺	никотинамидадениндинуклеотид (окисленная форма)
d	2'-дезоксирibo	NADH	никотинамидадениндинуклеотид (восстановленная форма)
DIPF (ДИФФ)	диизопропилфторфосфат		
DNA (ДНК)	дезоксирибонуклеиновая кислота		

NADP ⁺	никотинамидадениндинуклеотидфосфат (окисленная форма)	RNase (PHКаза) Ser T Thr	рибонуклеаза серин тимин треонин
NADPH	никотинамидадениндинуклеотидфосфат (восстановленная форма)	TPN ⁺ TPNH	см. NADP ⁺ см. NADPH
Phe	фенилаланин	Trp	триптофан
P _i	неорганический ортофосфат	TTP	тимидинтрифосфат
PP _i	неорганический пиррофосфат	Tyr	тирозин
Pro	пролин	U	урацил
RNA (PHK)	рибонуклеиновая кислота	UDP	уридиндифосфат
mRNA (мPHK)	информационная (матричная) РНК	UMP	уридинмонофосфат
rRNA (рPHK)	рибосомная РНК	UTP	уридинтрифосфат
tRNA (тPHK)	транспортная РНК	Val	валин

Именной указатель

Ануин Н. (Unwin N.) I: 222
Анфинсен Х. (Anfinson C.) I: 38, 40; III: 240
Арбер В. (Arber W.) III: 38, 240
Арнольд У. (Arnold W.) II: 185
Арнон Д. (Arnon D.) II: 188
Аткинсон Д. (Atkinson D.) II: 20
Аттер М. (Utter M.) II: 107
Афзелиус Б. (Afzelius B.) III: 278

Балтимор Д. (Baltimore D.) III: 180
Баркрофт Дж. (Barcroft J.) I: 73
Бенеш Р. и Рут (Benesch R., Ruth) I: 73
Бензер С. (Benzer S.) III: 77
Беннет К. (Bennett C.) III: 249
Бенс-Джонс Г. (Bence-Jones H.) III: 242
Берг П. (Berg P.) II: 141
Бергстром С. (Bergstrom S.) III: 297
Бернал Дж. (Bernal J.) I: 63; III: 292
Бернет М. (Burnet M.) III: 240, 255, 257
Бернстил М. (Birnstiel M.) III: 141
Блобел М. (Blobel G.) III: 158
Блоу Д. (Blow D.) I: 154
Блох К. (Bloch K.) II: 212
Бор К. (Bohr Ch.) I: 72
Браун Д. (Brown D.) III: 141
Браун М. (Brown M.) II: 218
Браунли Дж. (Brownlee G.) III: 158
Браунштейн А. (Braunstein A.) II: 162
Браше Ж. (Brachet J.) III: 46
Бреннер С. (Brenner S.) III: 49, 68
Бриттен Р. (Britten R.) III: 138
Брэгг Л. (Bragg L.) I: 64
Бухнер Г. (Buchner H.) II: 23
Бухнер Э. (Buchner E.) II: 23
Бьюкенен Дж. (Buchanan J.) II: 257
Бэйлисс У. (Bayliss W.) III: 282

Вагелос П. (Vagelos P.) II: 151
Валентайн Р. (Valentine R.) III: 239
Ван-Нил К. (Van Niel C.) II: 186

Варбург О. (Warburg O.) II: 24, 96
Вейн Дж. (Vane J.) III: 298
Вейсс С. (Weiss S.) III: 52
Веннесланд Б. (Vennesland B.) II: 62
Вестхеймер Ф. (Westheimer F.) II: 62
Виноград Дж. (Vinograd J.) III: 20
Вуд В. (Wood W.) III: 173

Габер Ф. (Haber F.) II: 230
Гарден А. (Harden A.) II: 23
Гатано С. (Hatano S.) III: 272
Гауровиц Ф. (Haurowitz F.) I: 76
Гаффрон Г. (Gaffron H.) II: 185
Геллерт М. (Gellert M.) III: 33
Гензеляйт К. (Henseleit K.) II: 164
Герарт Дж. (Gerhart J.) II: 264
Гиббонс Я. (Gibbons J.) III: 278
Гиббс Дж. (Gibbs J.W.) II: 7
Гилберт У. (Gilbert W.) III: 39, 115
Гирке Э. фон (von Gierke E.) II: 129
Голдстейн Дж. (Goldstein J.) II: 218
Голл Дж. (Gall J.) III: 140
Грин Д. (Green D.) II: 143
Грин М. (Green M.) III: 239
Гринберг Дж. (Greenberg G.) II: 257
Гриффит Ф. (Griffith F.) III: 7
Гросс Э. (Gross E.) I: 30
Грюнберг-Маного М. (Grunberg-Manago M.) III: 70
Гулемин Р. (Guillemin R.) III: 295
Гэррод А. (Garrod A.) II: 176

Дальтон Дж. (Dalton J.) I: 25
Де-Ланж Р. (De-Lange R.) III: 129
Де Лусия Паула (DeLucia Paula) III: 27
Диккенс Ф. (Dickens F.) II: 96
Диккерсон Р. (Dickerson R.) II: 88
Динцис Г. (Dintzis H.) III: 98
Доти П. (Doty P.) III: 50
Дрейер У. (Dreyer W.) III: 249
Дэвис Д. (Davies D.) III: 244

Ерне Н. (Jerne N.) III: 240, 255

Жакоб Ф. (Jacob F.) III: 48, 49, 113, 114

Зимм Б. (Zimm B.) III: 18

Ингенхауз Я. (Ingenhousz J.) II: 182

Ингольд К. (Ingold C.) II: 69

Инграм В. (Ingram V.) I: 92

Йонг У. (Young W.) II: 23; III: 347

Кабат Э. (Kabat E.) III: 243

Кальвин М. (Calvin M.) II: 193

Кан Р. (Cahn R.) II: 69

Капоши М. (Kaposi M.) III: 36

Карновский М. (Karnovsky M.) III: 322

Картье Ж. (Cartier J.) I: 186

Каспар Д. (Caspar D.) III: 168

Касперсон Т. (Caspersson T.) III: 46

Катц Б. (Katz B.) III: 331

Кватреказас П. (Cuatrecasas P.) III: 293

Кейзер А. (Kaiser A.) III: 122

Кейлин Д. (Keilin D.) II: 76

Кельвин (Kelvin) II: 62

Кендрию Дж. (Kendrew J.) I: 50

Кеннеди Ю. (Kennedy E.) II: 141; III: 313

Келлер Дж. (Koller G.) III: 241

Клуг А. (Klug A.) III: 91, 168

Кнооп Ф. (Knoor F.) II: 66, 141

Коллман Дж. (Collman J.) I: 59

Корана Г. (Khorana H.) III: 72, 74

Кори Г. (Cori G.) II: 24, 115, 129; III: 282

Кори К. (Cori C.) II: 24, 115, 128; III: 282

Кори Р. (Corey R.) III: 33

Корнберг А. (Kornberg A.) III: 21, 22

Корнберг Р. (Kornberg R.) I: 223; III: 129

Кошланд Д. (Koshland D.) I: 121, 148; II: 38;
III: 351

Краут Дж. (Kraut J.) I: 160

Кребс Г. (Krebs H.) II: 18, 66, 164

Кребс Э. (Krebs E.) III: 287

Крик Ф. (Crick F.) III: 11, 67, 68, 168

Кэмпбелл А. (Campbell A.) III: 185

Кэрнс Дж. (Cairns J.) III: 27

Кюне Ф. (Kuhne W.) II: 24

Леви А. (Loewy A.) III: 272

Леви-Монтальчини Рита (Levi-Montalcini R.) III:
300

Ледер Ф. (Leder P.) III: 251

Ледерберг Дж. (Lederberg J.) III: 202, 224, 225

Лелуа Л. (Leloir L.) II: 120

Леман Р. (Lehman R.) III: 26

Ленинджер А. (Lehninger A.) II: 141

Лёвенштейн В. (Loewenstein W.) III: 322

Ли Ч. (Li C.) III: 296

Линд Дж. (Lind J.) I: 186

Линен Ф. (Lynen F.) II: 143, 174

Липкин Д. (Lipkin D.) III: 284

Липман Ф. (Lipmann F.) II: 17; III: 109

Липском У. (Lipscomb W.) I: 145; II: 266

Листер Дж. (Lister J.) I: 167

Локк (Lock) III: 257

Любимова М.Н. III: 263

Майер Ю. (Mayer J.) II: 183

Мак-Карти М. (McCarty M.) III: 8, 10

Мак-Коннелл Г. (McConnell H. M.) I: 224

Мак-Леод К. (Mac Leod C.) III: 8, 10

Макнаб Р. (Macnab R.) III: 351, 352

Марголиаш Э. (Margoliash E.) II: 90

Мармур Дж. (Marmur J.) III: 50

Мартиус К. (Martius C.) II: 66

Мейергоф О. (Meyerhof O.) II: 24

Ментен М. (Menten M.) I: 111

Мерфи В. (Murphy W.) II: 170

Меселсон М. (Meselson M.) III: 15, 49

Миллер О. (Miller O.) III: 141

Милстайн Ц. (Milstein C.) III: 158, 241

Мино Ф. (Minot G.) II: 170

Митчелл П. (Mitchell P.) II: 79, 91; III: 314

Михаэлис Л. (Michaelis L.) I: 109, 111

Моно Ж. (Monod J.) I: 118; II: 48, 49, 113, 114

Мюллер П. (Mueller P.) I: 207

Мюллер-Хилл Б. (Muller-Hill B.) III: 115

Мэксэм А. (Maxam A.) III: 39

Натанс Д. (Nathans D.) III: 38

Нахмансон Д. (Nachmansohn D.) III: 334

Нидергерке Р. (Niedergerke R.) III: 261

Николсон Г. (Nicolson G.) I: 218

Ниренберг М. (Nirenberg M.) III: 69, 70, 72, 75

Нойберг К. (Neuberg C.) II: 24

Номура М. (Nomura M.) III: 98

Огстон А. (Ogston A.) II: 61

Оказаки Р. (Okazaki R.) III: 31

Осава Ф. (Osawa F.) III: 272

Отто Дж. (Otto J.) I: 173

Очоа С. (Ochoa S.) II: 143; III: 70

Палад Г. (Palade G.) II: 72

Пардю М. (Pardue M.) III: 140

Парк Дж. (Park J.) III: 225

Парнас Я. (Parnus J.) II: 24

Пастер Л. (Pasteur L.) II: 23, 284

Перутц М. (Perutz M.) I: 50, 63

Полинг Л. (Pauling L.) I: 33, 90, 101, 142; II: 240

Поляк Р. (Poljak R.) III: 244

Портер Р. (Porter R.) III: 237, 239

Прелог В. (Prelog V.) II: 69

**Именной
указатель**

Пристли Дж. (Priestley J.) II: 181
Пташне М. (Ptashne M.) III: 122
Пфеффер В. (Pfeffer W.) III: 349

Раус П. (Rous P.) III: 186
Ревель Ж.-П. (Revel J.-P.) III: 322
Рейхард П. (Reichard P.) II: 267
Рич А. (Rich A.) III: 12, 91
Роузман С. (Roseman S.) III: 314
Рудин Д. (Rudin D.) I: 107
Рэкер Э. (Racker E.) II: 83, 96, 201

Сабатини Д. (Sabatini D.) III: 158
Сазерленд Э. (Sutherland E.) III: 282
Сайденем Т. (Sydenham T.) II: 274
Сатир П. (Satir P.) III: 278
Сведберг Т. (Svedberg T.) III: 48
Сент-Дьёрдьи А. (Szent-Gyorgyi Albert) II: 66;
III: 265
Сент-Дьёрдьи Э. (Szent-Gyorgyi Andrew) III: 264
Сиденхем Т. (Sydenham T.) III: 295
Сингер Дж. (Singer J.) I: 218
Синсхеймер Р. (Sinsheimer R.) III: 16
Скоу Й. (Skou J.) III: 306
Слэк Х. (Slack C.R.) II: 198
Смит Г. (Smith H.) III: 38
Снелл Э. (Snell E.) II: 162
Соссюр Т. де (de Sassure T.) II: 182
Спигелман С. (Spiegelman S.) III: 50, 183
Стайнер Д. (Steiner D.) III: 291
Сталь Ф. (Stahl F.) III: 15
Старлинг Э. (Starling E.) III: 282
Стеக்கениус В. (Stoeckenius W.) II: 200, 201
Стромингер Дж. (Strominger J.) III: 225
Строуд Р. (Stroud R.) I: 162
Сэнгер Ф. (Sanger R.) I: 26, 29; III: 41, 290

Татум Э. (Tatum) III: 202
Тейлор Э. (Taylor E.) III: 265
Темин Х. (Temin H.) III: 189, 190
Тонегавы С. (Tonegawa S.) III: 249, 251
Торричелли Э. (Torricelli E.) I: 70
Тэлмедж Д. (Talmage D.) III: 255

Уайман Дж. (Wyman J.) I: 118
Уилкинс М. (Wilkins M.) III: 11
Уилсон И. (Wilson I.) III: 336
Уильямс Р. (Williams R.) III: 169
Уитеринг У. (Withering W.) III: 310
Уиткоп Б. (Witkop B.) I: 30
Уолд Дж. (Wald G.) III: 343
Уолш Д. (Walsh D.) III: 287

Уотсон Дж. (Watson J.) III: 11, 32, 81, 168
Уэбстер Д. (Webster D.) II: 225-226
Уэйкил С. (Wakil S.) II: 149

Филлипс Д. (Phillips D.) I: 133
Фишер Э. (Fischer E.) I: 110; II: 123
Флеминг А. (Fleming A.) I: 132; III: 224
Флори Х. (Florey H.) III: 224
Франклин Розалинда (Franklin Rosalind) III: 11
Френкел-Конрат Х. (Fraenkel-Conrat H.) III: 169
Фуллер Б. (Fuller B.) III: 168

Хайяши О. (Hayaishi O.) II: 175
Хаксли Э. (Huxley A.) III: 261, 266, 327
Холдейн Дж. (Haldane J.B.S.) I: 173
Харрисон С. (Harrison S.) III: 176
Хендерсон Р. (Henderson R.) I: 222
Хенсон Дж. (Hanson J.) III: 261
Хеппель Л. (Heppel L.) III: 284
Херик Дж. (Herrick J.) I: 88
Херриот Р. (Herriott R.) III: 9
Херши А. (Hershey A.) III: 9, 10
Хехт З. (Hecht S.) III: 340
Хёрвиц Дж. (Hurwitz J.) III: 52
Хилл Р. (Hill R.) II: 187
Ходжкин А. (Hodgkin A.) III: 327
Ходжкин Д. (Hodgkin D.) I: 63; II: 170; III: 292
Холдейн Дж. (Haldane J. B. S.) I: 173
Холли Р. (Holley R.) III: 90
Холлидей Р. (Holliday R.) III: 201
Хорекер Б. (Horecker B.) II: 96
Худ Л. (Hood L.) III: 251
Хьюбер Р. (Huber R.) I: 162
Хэч М. (Hatch M.D.) II: 198

Цвет М. (Tswett M.) I: 93
Цукеркандл Э. (Zuckerkan dl E.) I: 101

ЧансБ. (Chance B.) II: 81
Чаргафф Э. (Chargaff E.) III: 14
Чейз Марта (Chase Martha) III: 9, 10
Чейн Э. (Chain E.) III: 224

Шанже Ж.-П. (Changeux J.-P.) I: 118
Шахман Х. (Schachman H.) II: 264
Шемин Д. (Shemin D.) II: 248
Шестранд Ф. (Sjostrand F.) II: 72

Эбаши С. (Ebashi S.) III: 269
Эдгар Р. (Edgar R.) III: 173
Эдельман Дж. (Edelman G.) III: 238, 244
Эдман П. (Edman P.) I: 30
Эдмундсон А. (Edmundson A.) III: 248
Эйвери О. (Avery O.) III: 8, 10

Эймс Б. (Ames B.) III: 82
Эмбден Г. (Embden G.) II: 24
Эмерсон Р. (Emerson R.) II: 185, 187
Энгельгардт В. А. III: 263
Эфрусси Б. (Ephrussi B.) III: 137

Ягендорф А. (Jagendorf A.) II: 191
Янофски Ч. (Janofsky C.) III: 77, 118
Ярдецкий О. (Jardetzky O.) III: 309

Указатель латинских названий

Amantia phalloides III: 146, 147
Bacillus brevis III: 107
Bombix mori III: 144
Clostridium histolyticum I: 191
Corynebacterium diptheriae III: 155
Dichapetalum cymosum II: 63
Drosophila melanogaster III: 80, 128, 143, 144
- *virilis* III: 140
Electrophorus III: 332
Escherichia coli III: 19, 22, 34, 51-55, 60, 116
- ДНК III: 28-31
- конъюгация III: 197
- мРНК III: 47
- оболочка III: 226
- рибосомы III: 97
- тРНК III: 48
- хеморецепторы III: 349
- электрофорез белков I: 26

-*pol*-мутанты III: 27, 28
Haemophilus influenzae III: 38, 178
Halobacterium halobium I: 221
Micrococcus lysodeikticus I: 132
Penicillium III: 224
Physarum polycephalum III: 64, 272
Rhizobium III: 230
Rhizopus I: 166
Salmonella III: 82-84
- *typhimurium* III: 226, 227, 229
-- жгутики III: 350
Streptomyces III: 61
Strongylocentrotus purpuratus III: 144
Torpedo III: 332
Vibrio cholerae III: 289
Xenopus III: 151
- *laevis* III: 143

Предметный указатель

Абеквоза III: 228
Авидин II: 114
Агглютинин I: 214
Адаптация при зрении III: 345
-- хемотаксисе III: 352
Адапторная молекула III: 67-68
Аденилат *см.* Аденозин-5'-монофосфат
Аденилатдезаминаза II: 273
Аденилаткиназа II: 10, 264; III: 271
Аденилаттрансфераза II: 247; III: 285-287
Аденилатциклаза в жировой ткани II: 140
- и обмен гликогена II: 123
- стимуляция холерным токсином III: 289
Аденилилтрансфераза II: 246-247
Аденилирование II: 246-247, 283
Аденилосукцинат II: 260
Аденин II: 255-257; III: 6, 13, 14
- таутомерные формы III: 81, 82
Аденин-фосфорибозилтрансфераза II: 261
S-Аденозилгомоцистеин II: 238
S-Аденозилметионин II: 204, 207, 237-239; III: 60, 150, 171, 352
Аденозин II: 255-257
Аденозиндифосфат (ADP) II: 10, II, 256
Аденозиндифосфат, рибозилирование III: 156, 289
Аденозин-3',5'-монофосфат (циклический AMP, cAMP) III: 116-117
- в жировых клетках II: 140
- и действие гормонов III: 282-289
-- обмен гликогена II: 122-123, 125-128
Аденозин-5'-монофосфат (AMP) II: 10, 256, 259-260
Аденозинтрифосфат (АТФ) II: 10-13, 141, 255, 256, 280-281
- в мышцах III: 270-271
-- ресничках III: 278, 279
- образование при гликолизе II: 31-33
--- окислении жирных кислот II: 144-145
--- окислительном фосфорилировании II: 71, 78-81, 83-84
--- фотосинтезе II: 190-194, 200
- при генетической рекомбинации III: 200
-- репликации ДНК III: 32-33

-- транспорте ионов III: 270-271, 304, 306-308, 311-312
Аденозинтрифосфатаза *см.* АТРаза
Адреналин II: 122-123, 248, 292; III: 282, 284, 339
Адреногенитальный синдром *см.* Вирилизм
Адренодоксин II: 222
Адренокортикотропный гормон (АКТГ) I: 47; II: 222
β-Адренэргические рецепторы III: 286
Азасерин II: 279
Азид II: 81
Азотистая кислота III: 81-82
Азотистые основания. *См. также* Пиримидины, Пурины
-- номенклатура II: 255-257; III: 6, 24
-- пары III: 11-15, 19-20
Азотистый баланс II: 233
Азотфиксация II: 230-232
Аконитаза II: 50, 63-64
Аконитат II: 50, 51
Акридины III: 82
Аксонема III: 277-279
Аксоны III: 300, 327
АКТГ *см.* Адренокортикотропный гормон
Активный транспорт III: 304-306
- центр I: 109-110
-- карбоксипептидазы A I: 146
-- лизоцима I: 134, 140
-- рибонуклеазы S I: 17
-- химотрипсина I: 157-159
Актин III: 261, 263, 265-266, 269-276
Актиномицин III: 61-64, 116
Актомиозин III: 265
Акцелерин I: 175
Алании I: 20; II: 167, 233-234
Аланин-аминотрансфераза II: 160
Аланиновая тРНК III: 94-95
Алкаптонурия II: 176
Алкенильный эфир глицерола II: 208
Алкогольдегидрогеназа II: 36
Аллантаоиказа II: 275
Аллантаин II: 273, 275
Аллантаиновая кислота (аллантаат) II: 273, 275
Аллантаиназа II: 275
Алельное исключение III: 252
D-Аллоза II: 46
Аллоксан III: 295
Аллолактоза III: 112
Аллопуринол II: 276
Аллостерические белки I: 69, 75, 77, 84

- взаимодействия I: 106, 118-122; II: 282-283
 - свойства гемоглобинов I: 69-87
 - ферменты I: 118-122; II: 34-35, 123-125, 264-268
 Аллостерический активатор II: 120
 Аллостерическое ингибирование I: 116, 120
 - различие III: 242
 Альдимины II: 162, 163
 Альдозы II: 24, 29, 46
 Альдолаза II: 30, 38-39
 - при фотосинтезе II: 195-196
 Альдол-гистидиновый комплекс I: 190
 Альдольная конденсация I: 190
 Альдольное расщепление II: 27
 D-Альтроза II: 46
 α-Аманитин III: 146-147
 Амелоптерин II: 270; III: 189
 Амидная связь I: 23
 Амилозы II: 131
 Амилопектин II: 131
 Аминоакрилат II: 163
 Аминоациладенилат III: 88
 Аминоацил-АМР III: 89
 Аминоацил-тРНК III: 87-89, 103
 - гибридная III: 93
 Аминоацил-тРНК-синтетаза III: 88-90, 100
 Аминоацильный участок (А-участок) III: 102-104
 γ-Аминобутират *см.* γ-Аминомасляная кислота
 Аминобутират-глутамат-аминотрансфераза III: 340
 5-Аминоимидазолрибонуклеотид II: 259
 Аминокислотные остатки I: 81-83
 -- в гемоглобине I: 65-66
 - последовательности в адренокортикотропном гормоне I: 47
 --- белках I: 26-27, 37-39, 63; III: 7
 --- гемоглобине I: 63-65
 --- гликофоре I: 216
 --- иммуноглобулинах III: 240-244
 --- инсулине I: 27
 --- лизоциме I: 35
 --- миоглобине I: 56, 63
 --- рибонуклеазе I: 39
 --- эпидермальном факторе роста III: 301
 -- гомологичные участки I: 63; III: 244
 Аминокислоты I: 19-23, 32; II: 160-179, 247-248; III: 68-69, 75, 87-89
 - в гистонах III: 129
 - D-изомеры I: 20; III: 219
 - N-концевые I: 28-30
 - незаменимые II: 230, 233-234, 239
 - способность к образованию водородных связей I: 123-124
 - транспорт III: 312-313
 - *pK* I: 45, 46
 δ-Аминолевулилат II: 249
 δ-Аминолевулилат-синтетаза II: 249
 γ-Аминомасляная кислота (ГАМК) II: 274; III: 338-340
 Аминопептидаза III: 105
 β-Аминопропионитрил I: 190
 Аминоптерин II: 270
 2-Аминопурин III: 81

Аминосахара I: 193
 Амнитал II: 81
 Аммоний (NH_4^+) II: 160-166, 230-232
 Аммоникс I: 210
 Аммонотелесические организмы II: 164
 Амниоцентез II: 212
 Амплификация II: 128; III: 141, 145
 Амфипатические соединения I: 204
 Анаболизм II: 205
 Анаболические пути II: 21
 Аналоги оснований III: 24, 81, 83
 Анаплеротические реакции II: 64, 108
 Ангстрем I: 34
Андерсена болезнь II: 130
 Андрогены II: 221-224
 Андростендион II: 223, 224
 Анемия I: 88-90; II: 103, 170, 172
 Анионный канал I: 213
 Антибиотики III: 304, 316-320. *См. также по названиям*
 - как ингибиторы транскрипции III: 61-62
 - устойчивость к ним III: 205-206
 Антибиотики-каналообразователи III: 317
 Антибиотики-переносчики III: 316, 318
 Антигемофильный фактор I: 173
 Антиген (иммуноген) III: 234
 Т-Антиген III: 151
 Антиген-антитело, комплексы III: 238, 256
 Антигенная детерминанта III: 234
 Антиген-связывающие участки антител III: 236-237, 240, 245-246
 Антитод III: 336-337
 Антикоагулянты I: 170, 176
 Антикодон III: 68, 91-95
 Антикодонавая петля III: 91, 93
 Антимидин А II: 80, 81
 Антипараллельный слой II: 37
 Антипорт III: 312-313
 Антисыворотка III: 236
 Антитела *см.* Иммуноглобулины
 Антитромбин I: 175
 Антранилат II: 241, 242
 АПБ *см.* Ацилпереносящий белок
 Апомиоглобин I: 62-63
 Апопротеин I: 48
 Арабиноза II: 46; III: 117
 Арабинозный оперон III: 117-119
 Арабино-изомеразы III: 116, 117
 Арахидат II: 139
 Аргиназа II: 164
 Аргинин I: 21, 22; II: 169
 - в цикле мочевины II: 164—165
 Аргининосукцината II: 165
 Аргининосукцинат II: 164—165
 Аргининосукцинат-синтетаза II: 164
 Арсенат II: 41
 1-Арсено-3-фосфоглицерат II: 41
 Асимметрия биологических мембран I: 200, 214, 219
 - системы транспорта Na^+ и K^+ I: 219

Аскорбиновая кислота (витамин С) I: 181, 186, 187
 Аспарагин I: 21, 22; II: 168, 234
 Аспартат I: 21, 22; II: 233-234
 - в биосинтезе пиримидинов II: 262
 -- цикле мочевины II: 164-165
 - трансаминирование II: 168-169
 Аспартат-карбомилтрансфераза II: 262
 Аспартат-транскарбамоилаза (АТКаза) II: 264-266
 β-Аспартилфосфат III: 307
 Аспирин (ацетилсалицилат) III: 298, 299
 Атеросклероз II: 220
 Атрактилозид II: 86
 Аттенуация III: 59, 119-120
 Аутоиммунное заболевание III: 338
 Афинная метка I: 157-158; III: 243
 - хроматография I: 25-26; III: 236
 Ацетальдегид II: 36
 Ацетат I: 10; III: 334
 N-Ацетилгалактозамин I: 214
 N-Ацетилглюкозамин (NAG) I: 133, 137, 138, 214
 - в клеточной стенке бактерий III: 219, 221
 N-Ацетилглюкозамин-1-фосфат III: 221
 Ацетилкоэнзим А *см.* Ацетил-СoА
 Ацетиллипоамид II: 57
 N-Ацетилмуравовая кислота (NAM) I: 133
 - в клеточной стенке бактерий III: 219-223
 N-Ацетилнейраминат II: 209, 210
 Ацетил-трансацетилаза II: 151, 152
 Ацетилфосфат II: 12
 Ацетилхолин III: 330-334
 Ацетилхолиновый рецептор III: 332-338
 Ацетилхолинэстераза I: 114, 157; III: 330, 334-336, 338
 Ацетильные группы II: 16
 Ацетил-СoА II: 5, 16, 49, 287-288
 - и жирные кислоты II: 143-144, 149
 -- синтез ацетилхолина III: 330
 - образование из лейцина II: 174
 --- пирувата II: 49
 -- при диабете III: 294
 Ацетил-СoА—карбоксилаза II: 149-151, 286
 Ацетоацетат II: 147-148, 174, 294
 - при диабете III: 294
 Ацетоацетил-АПБ II: 152
 Ацетоацетил-СoА II: 147, 166
 Ацетон II: 147; III: 194
 Ациладенилат I: 141-142, 161
 Ацилирование I: 156, 159
 Ацилкарнитин II: 143
 Ацил-коффермент А *см.* Ацил-СoА
 Ацилпереносящий белок (АПБ) II: 151
 N-Ацилсфингозин II: 208
 Ацил-АМР II: 142
 Ацил-СoА I: 35-36; II: 142-145
 Ацил-СoА-дегидрогеназа II: 144
 Ацил-СoА: карнитин-ацилтрансфераза II: 143
 Ацил-СoА-синтетаза II: 141
 Ацил-СoА-холестерол-ацилтрансфераза II: 220

АМР *см.* Аденозин-5'-монофосфат
 АТ-пары III: 13, 20
 АТР *см.* Аденозинтрифосфат
 АТР-ADP-транслоказа II: 86
 АТРаза в митохондриях II: 84
 -- мышцах III: 264-266
 - и транспорт ионов III: 306-313

БАК *см.* Белковый активатор катаболизма
 Бактерии, ДНК в них III: 19, 20, 100, 218-232
 - конъюгация III: 197, 201-205
 - пространственный градиент III: 351-352
 - хеморецепторы III: 349-353
 - экспрессия эукариотических генов III: 212-213
 Бактериородопсин I: 221-222; II: 200-201
 Бактериофаги *см.* Фаги
 Бактериохлорофилл II: 189
 Бацитрацин III: 161
 Белки I: 18-47; III: 154-159. *См. также* по названиям
 - вирусов III: 179-180, 183
 - вспомогательные (морфопоэтические) III: 173-174
 - дестабилизирующие спираль ДНК III: 33
 - ковалентная модификация I: 105-106; II: 283
 - кодируемые вирусом SV-40 III: 188
 - конформация I: 32-34, 38, 40-42, 120
 - мембран I: 208-218; III: 156-158, 326
 - митохондрий III: 159
 - при талассемии III: 154
 - рекомбинации (*recA*, *recB*, *recC*, *recBC*) III: 200
 - рибосом III: 158
 - секреторные III: 156-158
 - синтез III: 76, 87-110. *См. также* Трансляция, Рибосомы
 -- в бактериях III: 100-102
 - содержащие негемовое железо II: 32, 75. *См. также* Железопротейны
 Белки соединительной ткани I: 179-198
 - фагов III: 124, 183
 - хлоропластов III: 159
 Белки-антидетерминаторы III: 59
 Белковый активатор катаболизма (БАК) III: 116, 117
 Сто-белок III: 124
 Fe-S-белок *см.* Железосеропротейны
 G-белок III: 286-287
 HPr-белок III: 315
 Мо-Fe-белок II: 231
 гесА-белок III: 200
 гер-белок (хеликаза) III: 33
 ρ-белок (ρ-фактор) III: 58-60
 Белые мышцы III: 271
 Бензилпенициллин III: 224, 226
 Бензойная кислота II: 141
Бенс-Джонса белок III: 242
 Бери-бери II: 60
 Бесклеточная система III: 70, 151, 155
 Бетаин II: 238
 Бехангат II: 139
 Библиотека ДНК III: 211-212
 Бикарбонат *см.* Диоксид углерода

- Биливердин II: 251
Билирубин II: 251-252
Бимолекулярный слой (бислой) I: 205-208
Биологические процессы, их скорость I: 12
Биотин II: 107-108, 114, 149-150
Биотинкарбоксилаза II: 150
Биполярные ионы (цивитерионы) I: 19
1,3-Бисфосфоглицерат (1,3-БФГ) I: 15; II: 41-44
2,3-Бисфосфоглицерат (2,3-БФГ) I: 73-75, 80-82; II: 41-44
Бисфосфоглицератмутаза I: 115; II: 42
Болезнь накопления гликогена II: 131
Бонгкрекова кислота II: 86
Бора эффект I: 72-73, 81-84
Борсодержащие кислоты I: 178
Брожение II: 23
5-Бромдезоксисуридин III: 135
Бромистый циан I: 30, 32
5-Бромурацил III: 81
 α -Бунгаротоксин III: 333
Бутирил-АПБ II: 152, 153
Буферная емкость раствора I: 46
БФГ см. Бифосфоглицерат
- Варфарин I: 170, 171
Ведущая нить III: 31
Векторы для клонирования ДНК III: 207, 210-211
Вернике - Корсакова синдром II: 102
«Ветвящий» фермент II: 121
Вирилизм II: 224-225
Вирус бешенства III: 181
- везикулярного стоматита III: 180-181
- кустистой карликовости томата III: 176
- папилломы III: 188
- полиомиелита III: 179-182
- полиомы III: 186-189
- саркомы Рауса III: 179, 186
- табачной мозаики (ВТМ) III: 167-173
--- мутации III: 77
- ящура III: 179
- Q β III: 182, 183
- R17 III: 182, 183
- SV-40 III: 55, 186-189
-- генетическая карта III: 189
Вирусы, оболочка III: 167-168
- перекрывающиеся гены III: 78, 183
- РНК-содержащие III: 178-179, 189-190
- самосборка III: 167-194
Витамин А (полностью-транс-ретинол) II: 17, 18; III: 342
- В₁ (тиамин) II: 60
- В₂ II: 17
- В₆ (пиридоксин) II: 17, 124, 161
- В₁₂ (кобаламин) II: 170-172, 238
- D II: 223-224
- D₂ II: 18
Витамин D₃ II: 223-224
- E II: 18
- K I: 170; III: 248
- K₁ II: 17, 18; III: 248
- K₂ I: 170; II: 226
Витамины II: 17-18. См. также по названиям
Вода I: 10, 125-127
Водород, стереоспецифический перенос II: 62-63
Водородные связи I: 122-124
-- необычные III: 92
Водоросли II: 193
Воротный ток III: 330
Времена биологических процессов I: 11-12
Временной градиент III: 351-352
Вставочные последовательности (вставки, интроны, IS-элементы) III: 78-83, 150-151, 196, 202, 206-207
ВТМ см. Вирус табачной мозаики
Вторичная структура I: 37
Вырожденность кода III: 69, 76
-- гипотеза качания III: 94-95
Высокий потенциал переноса фосфатной группы II: 11
Высокоэнергетические связи II: 11-12
- Газовая гангрена I: 191
Галактиол II: 135
Галактоза I: 106; II: 46, 134-135; III: 112
Галактоземия II: 135
 β -Галактозидаза III: 112-113
Галактозидпермеаза III: 112
Галактозилтрансфераза II: 132
Галактозо-1-фосфат II: 134
Галактозо-1-фосфат-уридилтрансфераза II: 134, 135
Галактокиназа II: 134
Галактолипиды II: 184
Галобактерии II: 200-201
Галотан II: 111
Ганглиозиды I: 204; II: 208-211
Гаптен III: 234-236, 240
Гаптен-антитело, комплекс III: 236-237
Гаптенная детерминанта III: 234
Гексадеканоат II: 139
Гекса-NAG III: 137-138
Гексозомонофосфатный путь см. Пентозофосфатный путь
Гексозы I: 25, 46, 47
Гексокиназа I: 18; II: 28, 29, 38, 43
Геликаза III: 33
Гель-фильтрация I: 25
Гель-электрофорез см. Электрофорез в полиакриламидном геле
Гем I: 48-50; II: 249, 250
- в миоглобине I: 56-60
- связывание с CO₂ I: 60-61
Гем а II: 77
Гем-гем, взаимодействие I: 72
Гемоглобин I: 48-87
- гены III: 154-155
- мутации I: 98-100; III: 77. См. также Серповидноклеточная анемия, Талассемия
- плода I: 75; III: 154

- Гемоглобин А, А₂ I: 63
 - F I: 63
 - M I: 99
 - S I: 90-98
 - α- и β-цепи I: 63-65, 75
 Гем-оксигеназа II: 251
 Геморрагия I: 170, 175
 Гемофилия I: 172-173
 Ген. *См. также* Гены
 - овалальбумина III: 79, 81
 - фиброина III: 144-145
 - *cro* III: 123, 124
 - *i* III: 113-114
 - *ilv* III: 29
 - *J* III: 251-252
 - *src* III: 191-192
 - *trp* III: 30
 Генетическая рекомбинация III: 196-216
 Генетический код III: 68-69, 75-77
 Геномы, конструирование III: 196, 207-215
 - области гомологии III: 191, 200
 Гены. *См. также* по названиям
 - антител III: 248-250
 - вирусов III: 120, 121
 - влияние стероидных гормонов III: 298-299
 - гемоглобинов III: 154—155. *См. также* Молекулярные болезни
 - гистонов III: 143, 144
 - клонирование III: 196, 207-209, 214
 - коллинеарность III: 77-80
 - лимфоцитов III: 249-250
 - перекрывающиеся III: 77-79, 182-183
 - перестройки III: 196-216
 - разорванное строение III: 78-80, 145-146, 150, 151
 - рибосомных РНК III: 140-142
 - уникальные III: 144—145
 - фага Т4 III: 172-173
 - экспрессия III: 112-125
 - эукариот III: 78, 211-213
 Гепарансульфат I: 193
 Гепарин I: 176, 195
 Гептануклеотиды III: 140
 Гептозы II: 25; III: 228
 Геранилпирофосфат II: 214-216, 227
 Гетерогенная ядерная РНК (гяРНК) III: 148-149
 Гетерокарион I: 215-217
 Гетеротропные эффекты I: 120
 Гиалуроновая кислота I: 194, 195
 Гибридизация (гибриды) ДНК и РНК III: 29, 30, 50-52
 - *in situ* III: 140
 Гибридомы III: 240-241
 Гидразин I: 47; III: 40
 Гидрид-ион II: 39-40
 Гидроксиапатит (фосфат кальция) I: 189; III: 138
 3-Гидроксиацил-АПБ-дегидратаза II: 152
 L-Гидроксиацил-СоА II: 144
 D-3-Гидроксибутират II: 147
 Гидроксикобаламин II: 171
 21-Гидроксилаза I: 181; II: 224-225
 Гидроксиламин I: 32; III: 82, 336
 Гидроксизин I: 180, 182, 192
 3-Гидрокси-3-метилглутарил-СоА II: 147, 174, 213
 3-Гидрокси-3-метилглутарил-СоА - редуктаза II: 213, 217
 Гидроксиметилирование III: 173
 5-Гидроксиметилцитозин III: 173
 17α-Гидроксипрогестерон II: 224
 4-Гидроксипролин I: 22, 180-181, 192
 5-Гидрокситриптамин II: 248
 Гидроксифенилпируват II: 175, 176, 240
n-Гидроксифенилпируват-гидроксилаза II: 175
 Гидроксиэтиламинопирофосфат II: 56
 Гидролиз I: 104
 Гидрофильные группы I: 204
 Гидрофобные взаимодействия I: 127, 205-206
 - группы I: 204
 Гипераммонемия II: 166
 Гипервариабельные участки III: 243, 246
 Гипертермия II: 111
 Гиперхолестеролемия II: 219-220
 Гиперхромизм III: 19
 Гипогликемия III: 290
 Гипоксантин II: 259, 273, 276; III: 24, 82
 Гипоксантин-гуанин - фосфорибозилтрансфераза II: 261, 275-276
 Гипохромизм III: 138
 Гирке болезнь II: 129-130
 Гистамин I: 60; II: 248
 Гистидин I: 21, 22, 56; II: 242, 244
 - превращение в глутамат II: 168-169
 - участие в катализе I: 157-159
 Гистидиновые кодоны III: 120
 - опероны III: 122
 Гистидинол II: 244
 Гистидинолфосфат II: 244
 Гистоны III: 79, 127-130, 132-133, 136-137, 143
 Гладкий эндоплазматический ретикулум II: 282
 Гликоген II: 115-137
 Гликоген-синтаза II: 121, 126
 Гликоген-фосфорилаза (фосфорилазы α и β) II: 116, 117, 123-125
 Гликозаминогликаны I: 193, 195; III: 163
 Гликозидные связи I: 133; II: 117-118, 255
 Гликозилирование III: 163
 Гликолат II: 199
 Гликолиз (гликолитический путь) II: 23, 29-45, 283
 - наследственные нарушения II: 43-44
 N-Гликолилнейраминат II: 209
 Гликолипиды I: 203-205, 214, 216; III: 163
 Гликопептид-транспептидаза III: 223
 Гликопротеины I: 214-216; III: 159-163. *См. также* Коллаген
 Гликофорин А I: 213-214
 Гликохолат II: 215
 Глиоксилат II: 199, 274
 D-Глицеральдегид II: 25, 46
 Глицеральдегид-3-фосфат II: 30-32, 97, 98
 Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа II: 31,

- 39-41, 195
 Глицерол I: 201-203
 - как предшественник теихоевой кислоты III: 223
 - образование из триацилглицеролов II: 140
 Глицерол-3-фосфат I: 201; II: 11, 12, 84-85
 - как предшественник фосфатидных кислот II: 205
 - образование из глицерола II: 140-141
 Глицерол-фосфатацилтрансфераза II: 205
 Глицерол-3-фосфат-дегидрогеназа II: 84-85
 Глицеролфосфатный челночный механизм II: 85
 Глицилтирозин I: 146-148
 Глицил-тРНК III: 222
 Глицин I: 20; II: 235, 257; III: 71, 72, 97
 - в коллагене I: 180, 184
 - превращения II: 167
 - при синтезе порфирина II: 248
 Глицинамидрибонуклеотид II: 258
 Глицин-синтаза II: 235
 β-Глобин III: 78, 79, 151, 154
 Глобиновые гены III: 78, 79, 154
 Глутамат (глутаминовая кислота) I: 21, 22; II: 167-169, 232-234
 превращение в ГАМК III: 340
 - распад II: 160-161
 Глутаматаминотрансфераза II: 160
 Глутаматдегидрогеназа II: 160-161, 169, 232-233
 Глутамат-декарбоксилаза III: 339, 340
 Глутамат-синтаза II: 233
 Глутамин I: 21, 22; II: 169, 232-233
 - в фиброине I: 169
 - как донор азота II: 245
 Глутаминаза II: 169
 Глутамин-синтаза II: 232-233, 245-247
 Глутатион II: 103-104, 268
 Глутатионредуктаза II: 103, 105, 268
 Глюкогенные аминокислоты II: 167
 Глюкагон II: 122-123, 291-293; III: 282, 284, 286
 Глюкоза I: 10; II: 24-27, 46, 105-106, 285; III: 112, 113
 - в крови II: 292-293
 - ингибирование синтеза циклического АМР III: 116
 - и образование АТР II: 86
 - транспорт III: 312-313
 Глюкозилирование III: 173
 Глюкозо-1,6-бисфосфат II: 119
 Глюкозо-1-фосфат II: 12, 116-122, 285
 Глюкозо-6-фосфат II: 12, 28-30, 286
 -- в глюконеогенезе II: 107
 -- обмене гликогена II: 118-120, 122
 -- пентозо-фосфатном пути II: 95-100
 Глюкозо-6-фосфатаза II: 119-120, 129, 130
 Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа II: 96, 103-105, 285
 Глюкокортикоиды II: 221-222; III: 299
 Глюконеогенез II: 105-110, 112, 287
 - влияние инсулина III: 290
 α-D-Глюкопираноза II: 25
 Глюкуронат II: 252; III: 7
 Глюкуронид билирубина II: 252
 Голодание II: 293; III: 288
 Голофермент III: 54, 55
 Гольджи аппарат III: 161-163
 Гомогентизат II: 175
 Гомогентизатоксидаза II: 175
 Гомополипептиды III: 74
 Гомотропные эффекты I: 120
 Гомоцистеин II: 238-239
 Гомоцистеин-метилтрансфераза II: 238
 Гормональные регуляторы метаболизма II: 291
 Гормон-рецепторный комплекс III: 299-300
 Гормоны III: 282-309. *См. также* по названиям
 - влияние на синтез гликогена I: 122-123
 ---- лактозы II: 133
 - и активность ферментов I: 106
 -- циклический АМР III: 282-289
 Гош-конформация I: 219
 Грама метод окрашивания III: 218
 Грамицидин А III: 316, 320, 321
 - S III: 107-109
 Грам-отрицательные бактерии III: 218, 226-232
 Грам-положительные бактерии III: 218-226
 Граны II: 180
 Грибной яд III: 146-147, 276
 Гуанин I: 91; II: 255; III: 6, 13, 14
 Гуанингидрохлорид I: 39
 Гуаниннуклеозидсвязывающий белок *см.* G-белок
 Гуанинтрифосфат III: 149
 Гуанозин I: 255, 256; III: 289
 Гуанозинмонофосфат (GMP) II: 256-260
 Гуанозин-5'(β,γ-имидо)-трифосфат (Gpp[NH]p) III: 289
 Гуанозинмонофосфат (GMP) II: 256-260
 Гуанозинтрифосфат (GTP) II: 52, 109; III: 102, 103, 289, 347
 D-Гулоза II: 46
 гЯРНК *см.* Гетерогенная ядерная ДНК
 GMP *см.* Гуанозинмонофосфат
 GTP *см.* Гуанозинтрифосфат
 Дальтон I: 25
 ε-Дансиллизин III: 237
 Дансилхлорид I: 29-30
 Дауэкс-50 I: 28
 Двигательные концевые пластинки III: 330
 Двойная спираль ДНК (двухцепочечная, двух-спиральная ДНК) III: 11-21
 Двойные связи I: 219-220
 Двуокись углерода *см.* Диоксид углерода
 Двухцепочечная ДНК *см.* Двойная спираль ДНК
 - РНК III: 47, 179, 192-193
 Деацилирование I: 155, 156, 159-161
 «Деветящий» фермент II: 118
 Дегидратазы II: 163
 Дегидратация II: 27, 50
 Дегидроаскорбиновая кислота I: 186
 Дегидрогеназы в пентозо-фосфатном цикле *см.*
 Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа, 6-

Фосфоглюконат-дегидрогеназа
 - в цикле трикарбоновых кислот *см.* Изоцитрат-дегидрогеназа
 - при гликолизе *см.* Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа
 -- окислении жирных кислот II: 145
 -- синтезе аминокислот *см.* Глутаматдегидрогеназа
 --- жирных кислот *см.* Малатдегидрогеназа
 -- фосфорилировании окислительном *см.* NADH-дегидрогеназа, Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа
 - янтарного полуальдегида III: 340
 7-Дегидрохолестерол II: 225
 5-Дегидрохолинат II: 240
 5-Дегидрошикимовая кислота (5-дегидрошикимат) II: 240
 Дезамидо-NAD⁺ II: 271, 272
 Дезаминирование аминокислот II: 160-163
 5'-Дезоксиаденозилкобаламин II: 171, 172
 Дезоксиаденозин II: 255, 256
 3-Дезоксиарабиногептулозонат-7-фосфат II: 240
 Дезоксигемоглобин I: 75-78, 80-81, 95-96
 Дезоксинуклеотидил-трансфераза (терминальная трансфераза) III: 209
 Дезоксирибоза II: 255, 256
 Дезоксирибонуклеаза III: 173
 Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) I: 15; III: 6-44, 128-147, 196-208. *См. также* Библиотека ДНК, Двойная спираль ДНК, Однопочечная ДНК, Рекомбинация ДНК, Репликация ДНК
 -- клонирование III: 207-214
 -- кольцевая III: 20-21, 29, 184
 -- липкие концы III: 209, 210
 - нетранскрибируемые и нетранслируемые участки III: 141, 143
 - связывание гормон-рецепторного комплекса III: 299-300
 - эукариотическая III: 133-136, 138
 Дезоксирибонуклеозиды II: 255
 Дезоксирибонуклеотидтрифосфаты III: 21-24
 Дезоксирибонуклеотиды II: 266
 Дезокситимидилат (dTMP) II: 268-269
 Дезокситимидин II: 255, 256
 Дезоксиуридилат (dUMP) II: 268, 269
 Дезоксицитидин II: 255, 256
 Декаметоний III: 337
 Декарбоксилирование II: 49, 51, 96, 109, 152
 Дексаметазон III: 299-300
 Декстран II: 131; III: 236-237
 α-Декстрин II: 131
 α-Декстриназа II: 131
 Делеции III: 80, 82, 83
 Денатурация I: 39
 Деполяризация III: 330
 Дерматансульфат I: 195
 Дерматоспараксис I: 188
 Десенсибилизация II: 343; III: 331
 Десмозин I: 193, 194

Деформилаза III: 105
 Дефосфокофермент А II: 272, 273
 Диабет III: 294
 Диазосоединения III: 243
 Диализ I: 24, 25
 Дибутирил-сАМР III: 286
 Дигидробиоптеринредуктаза II: 175
 Дигидроксиацетон (кетоза) II: 25, 47, 102
 Дигидроксиацетонфосфат II: 30-31, 140-141, 196
 3,4-Дигидроксибензиланилин (ДОФА) III: 339
 3,4-Дигидроксибензилгликольальдегид III: 340
 Дигидроксибензилэтиламин (дофамин) III: 339
 Дигидроксихолестерол II: 223
 Дигидролипоамид II: 57, 58
 Дигидролипоиддегидрогеназа II: 57
 Дигидролипоилтрансацилаза II: 56, 57
 Дигидрооротаза II: 263
 Дигидрооротат II: 263
 Дигидрофосфингозин II: 209
 Дигидротимин II: 275
 Дигидрофолат II: 269
 Дигидрофолат-редуктаза II: 269
 Дигитоксигенин III: 311
 Диизопропилфторфосфат (ДИФФ) I: 115, 157, 161; III: 335-337
 Дикумарол I: 170
 6-Диметиладенин III: 60
 Диметилаллилпирофосфат II: 214
 Диметилксантин III: 286
 Динеин III: 277-278
 Динитрофенильное производное бычьего сывороточного альбумина (ДНФ-БСА) III: 235
 Динитрофенол (ДНФ) III: 235, 237
 Диоксигеназа II: 175
 Диоксид углерода (двуокись углерода, CO₂) в цикле трикарбоновых кислот II: 53
 -- при глюконеогенезе II: 106-108
 --- при пентозофосфатном пути II: 95, 100
 --- синтезе жирных кислот II: 149
 ---- пуринов II: 257
 --- фотосинтезе II: 193-195, 197, 199
 -- связывание с кислородом I: 72, 73, 81
 -- транспорт в тропических растениях II: 198
 Дипептиды I: 23, 37
 Дисахарид-дипептидное звено III: 221-223
 Дисахариды II: 132
 Дистальный гистидин I: 56
 Дисульфидные связи I: 23-24, 38-39; III: 105, 244
 -- окисление I: 32, 38
 Дифосфатидилглицерол I: 203
 Дифосфопиридиннуклеотид *см.* Никотинамид-аденидиннуклеотид
 Дифракция рентгеновских лучей I: 52, 54
 Дифтерийный токсин III: 155-156
 Диффузия I: 114, 217-224
 - облегченная II: 86
 Диэлектрическая постоянная I: 126
 Ди-NAG I: 142
 ДНК *см.* Дезоксирибонуклеиновая кислота
 ДНК-гираза III: 33
 ДНК-зависимая РНК-полимераза III: 53
 ДНК-лигаза III: 26-27, 35
 ДНК-полимераза РНК-зависимая (обратная

- транскриптаза) III: 178, 190
 ДНК-полимеразы I: 105; III: 21-28, 32-35
 - дефектные III: 81
 - эукариотические III: 136
 ДНК-топоизомераза III: 27-28, 32, 33
 ДНФ-аминокислоты I: 29
 Додекановая кислота (додеканоат) II: 139
 Додецилдиметиламинооксид (ДДАО) I: 210
 Додецилсульфат натрия (ДСН) I: 209-211, 213
 Додецилтриметиламмонийбромид I: 210
 Докозаноат II: 139
 Домены I: 38, 162
 - антител III: 244-245, 248, 253
 Долихол III: 159
 Долихолпирофосфат III: 161
 Долихолфосфат III: 160-161, 221
 ДОФА III: 339
 ДОФА-декарбоксилаза III: 339
 Дофамин III: 339
 Дрожжи II: 23-24, 35
 ДСН см. Додецилсульфат натрия
 Дубликации генов III: 248-249
 Дыхание II: 71
 Дыхательный контроль II: 87-88
 - коэффициент II: 86
- Еноил-АПБ-редуктаза II: 152
 Еноил-СоА II: 144, 146
 Еноил-СоА-гидратаза II: 144
 Енол I: 32
 3-Енолпируватшикимат-5-фосфат II: 240
 Енолфосфаты II: 41
 Енолят-анион II: 39
 ES-комплекс см. Фермент-субстратные комплексы
- Жгутики III: 277, 350, 351
 Железо I: 49, 78-79
 - в белках см. Железопротеины, Железосеропротеины
 Железопорфирин I: 59-60
 Железопротеины II: 32, 75
 Железо-серные комплексы II: 75
 Железосеропротеины (Fe-S-белки) II: 52, 188, 230
 Желчные кислоты II: 215
 Жидкостно-мозаичная модель мембран I: 218-219
 Жир, накопление у перелетных птиц II: 295-296
 Жирные кислоты I: 220-221; II: 138-159, 286-289, 291
 -- в крови II: 294
 -- незаменимые II: 156; III: 297
 Жировая ткань II: 100-101, 140, 289-290; III: 298
- Замена оснований III: 80, 83
 Заменяемые аминокислоты II: 233
 Замораживание-скалывание I: 211
 Замораживание - травление I: 211, 212
 Зарин III: 335, 336
 Зеленые серные бактерии II: 186
 Зимаза II: 24
- Зимняя спячка II: 88, 91
 Зимогеновые гранулы I: 152, 153
 Зимогены I: 105, 152, 160. См. также Проферменты
 Зингиберин II: 226
 Змеиные яды III: 333
 Зрительные рецепторы см. Колбочки, Палочки
- Иглобрюх III: 328, 329
 D-Идоза II: 46
 β-Изгиб I: 37
 Изовалерил-СоА II: 174
 Изовалерил-СоА—дегидрогеназа II: 174
 Изозимы см. Изоферменты
 Изoleyцин I: 20; II: 170, 174, 243; III: 89
 Изомеризация II: 28-30
 Изомерия *цис-транс* (*цис-транс*-конфигурация) I: 219-220; III: 343-344
 Изопентилпирофосфат II: 212-214, 226
 Изопрен II: 212
 Изопреновые единицы III: 211
 Изопропилтиогалактозид III: 112, 113, 115
 Изоферменты II: 112
 Изоциановая кислота I: 98
 Изокитраза II: 159
 Изокитрат II: 50-51
 Изокитратдегидрогеназа II: 51
 Изoeлектрическая точка I: 68, 91
 Икосаэдрическая симметрия III: 168-169, 177
 Имидазолацетолфосфат II: 244
 Имидазолглицеролфосфат II: 244
 4-Имидазол-5-пропионат II: 168
 Иминокислоты I: 20
 Иммуноген см. Антиген
 Иммуноглобулин A (IGA) III: 246, 248
 - D (IgD) III: 246
 - E (IgE) III: 246, 248
 - G (IgG) III: 235-240, 243-244, 246, 247
 - M (IgM) III: 235, 236, 246
 Иммуноглобулиновые складки III: 244, 246
 Иммуноглобулины III: 160, 234-258. См. также Антиген-связывающие участки
 - классы II: 246, 248, 253-254
 - мРНК III: 151
 - трехмерная структура III: 244-245, 247
 Иммунный ответ III: 235, 255
 Иммунологическая память III: 256
 Иммунофлуоресцентная микроскопия III: 272-275
 Ингибирование (ферментативных реакций) I: 114-118
 - по принципу обратной связи I: 106; II: 243
 Индол-3-глицеролфосфат II: 247
 Индукторы III: 112-114
 Индуцированное соответствие III: 110, 111, 144, 148
 Инициаторная РНК III: 100-103
 Инициаторный комплекс III: 102
 Инициация синтеза белков III: 76, 101-102, 153

- ДНК III: 134
- РНК III: 55-56. *См. также* Промоторы
- факторы III: 102, 155, 209
- Инозин I: 74; III: 95
- Инозинат II: 259
- Инозитол I: 202
- Инсектициды I: 157; III: 335
- Инсерционная инактивация III: 210
- Инструктивная теория III: 240
- Инсулин I: 27; II: 291; III: 290-295
- синтез у *E. coli* III: 212, 214
- Инсулинома III: 213
- Интегральные мембранные белки I: 210, 213; III: 326
- Интеграция (в геном эукариотической клетки) вирусов III: 192
- фагов III: 120, 184-185
- Интеркаляция III: 62, 64, 82
- Интерферон III: 192-193
- Интроны (прерывающие последовательности) III: 79-80, 145, 252
- Информационные РНК (мРНК) III: 46-86, 148-154
- антител III: 252, 253
- синтетические III: 69-71
- трансляция III: 99-100
- Иодацетамид I: 115
- Ионная пара I: 122
- Ионные связи I: 122. *См. также* Солевые связи
- Ионный радиус III: 319, 320
- Ионообменная хроматография I: 25, 28
- Ионофоры *см.* Антибиотики-переносчики
- Ионы металлов III: 52. *См. также* Калий, Кальций, Натрий
- IS-элементы *см.* Вставочные последовательно-сти
- IgA, IgD, IgE, IgG, IgM *см.* Иммуноглобулин A, D, E, G, M

- Калиевые каналы III: 327, 328
- Калиевый потенциал III: 345
- Калий (ион K^+) и возбудимость мембран III: 326-328, 331
- связывание с антибиотиками III: 318-320
- Калликреин I: 175
- Кальвина цикл II: 196-199
- Кальмедулин III: 287
- Кальсеквестрин III: 270
- Кальциевый насос III: 270
- Кальций (ион Ca^{2+}), влияние на киназу фосфорилазы II: 126
- межклеточные контакты III: 323, 324
- подвижность клеток III: 274
- свертывание крови I: 171-172
- как медиатор для родопсина III: 345-346
- при зрении III: 332
- освобождении ацетилхолина III: 332
- регуляция мышечного сокращения III: 269-270

- транспорт III: 270-271, 311-312
- Кальциферол II: 18
- Кальцификация I: 189
- Канцерогены III: 82-84
- Капсид III: 167, 173
- N-Карбамоиласпарат II: 262
- N-Карбамоилизобутират II: 275
- Карбамоиловые эфиры III: 334-335
- Карбамоил-производное гемоглобина I: 83
- Карбамоилфосфат II: 165
- в синтезе пиримидинов II: 262
- цикле трикарбоновых кислот II: 164
- свободная энергия гидролиза I: 12
- Карбамоилфосфатсинтаза II: 165, 263-264
- Карбанион II: 101, 103
- Карбоангидраза I: 81, 104, 114
- Карбоксибиотин II: 108
- Карбоксибиотин-переносящий белок II: 150
- γ -Карбоксиглутамат I: 22, 23, 170, 171
- Карбоксильная группа II: 108
- Карбоксипептидаза A I: 132
- Карбоксипроотеиназы I: 166
- 1-(*o*-Карбоксифениламино)-1-дезоксирibuлозо-5-фосфат II: 242
- Карбоний (ион) I: 140, 141
- Карбонилдианид-*n*-трифторметоксифенилгидразон II: 88
- Кардиотонические стероиды III: 309-311
- Карнитин II: 142-143, 290-291
- β -Каротин II: 226-227
- Каротиноиды II: 226
- Каскадный механизм в обмене гликогена II: 128
- при действии гормонов III: 288-289
- свертывании крови I: 166-167
- регуляторный II: 247
- Катаболизм II: 205
- Катаболическая репрессия III: 116
- Катаболические опероны III: 116-117
- пути II: 21
- Каталаза II: 273
- Катализ I: 104, 140
- Каталитическая субъединица II: 265-266
- Каталитические группы I: 109
- Катехоламины II: 292; III: 338-339
- Катехол-О-метилтрансфераза III: 339, 340
- Катионные каналы III: 331
- Каучук II: 226
- «Качания» гипотеза III: 94-95
- Квазиэквивалентность III: 176
- Кератансульфат I: 193, 194
- Кетимины II: 162, 163
- Кетогенные аминокислоты II: 166-167
- 2-Кето-3-дезоксикетонат III: 228
- Кетозо-альдозные изомеризации II: 96
- Кетозы II: 25, 47, 294
- Кетоновые тела II: 147-148, 194; III: 294
- β -Кетотиолаза II: 144
- Килобазы III: 19
- Килодальтон I: 25
- Киназа фосфорилазы II: 123, 125-127
- Киназы II: 28; III: 191-192, 287, 288
- Кинин I: 174

- Кислород I: 69-72, 79-81
 - при гидролизе коллагена I: 181
 -- фотосинтезе II: 186-187, 190
 - транспорт I: 48
 Кислота I: 45
 Клатрин II: 219; III: 161
 «Кленового сиропа» болезнь II: 174-175
 Клетки, зародышевые линии III: 250
 - метаболизм II: 281-282
 - обкладки сосудистого пучка II: 198-200
 - образование антител III: 250-252, 254, 255
 - печени II: 28, 280, 290
 I-клеточная болезнь III: 163
 Клеточная подвижность III: 271-272, 276. См. также Микротрубочки
 - стенка (оболочка) бактерий I: 132-133; III: 218-232
 Клеточные мембраны I: 199-224; III: 304. См. также Белки мембран, Постсинаптическая мембрана
 -- асимметрия III: 163
 -- возбудимые III: 326-355
 -- проницаемость для Na^+ и K^+ III: 326-329
 -- реконструкция II: 201
 -- текучесть I: 219-221
 -- эндоплазматического ретикулума II: 156
 Клеточный цикл III: 136
 Клональная селекция III: 255-257
 Клонированная ДНК, библиотека III: 211-212
 Клонированные гены III: 196, 207-209, 214
 Клострипаин I: 32
 «Ключ-замок», модель ферментативного катализа I: 110
 Кобаламин II: 170-172
 Кобальт II: 170-171
 Кобратоксин III: 343
 Ковалентная модификация I: 105-106, 283
 Кодоны III: 68, 75
 - не кодирующие аминокислот III: 75
 - синонимические III: 76
 - узнавание антикодона III: 94-95
 Козимаза II: 24
 Колбочки III: 340, 347-348
 Колицин III: 202
 Колициногенные факторы III: 202
 Коллаген I: 19, 179-192
 Коллагеназы I: 191-192
 Колхицин III: 277
 Компартменты I: 199, 222; II: 283-284
 Комплемент I: 173; III: 238
 Комплементарная ДНК (кДНК) III: 213
 Кональбумин III: 146
 Конвергентная эволюция III: 348
 Конденсирующий фермент II: 50
 Конканавалин А I: 26, 214
 Конкатамеры III: 174-175
 Конкурентное ингибирование I: 115-118
 Коннексоны III: 323
 Константа диссоциации I: 86, 113
 - Михаэлиса (K_m) I: 111-114
 Константные участки (С-области) III: 241-244, 249, 253-254
 Конститутивные мутанты III: 113
 Конформационная гипотеза сопряжения II: 79
 Конформационное равновесие I: 120
 Конформационное равновесие I: 120
 Конформация кресла I: 32-34, 137; II: 26
 - миоглобина I: 55, 57
 - полипептидных цепей I: 32-34, 37, 38, 40-42
 - связей С—С в мембранах I: 219-221
 Концевые пластинки III: 332
 Кооперативное связывание I: 119-121
 - взаимодействие в гемоглобине I: 72, 79-80
 --- коллагене I: 184-185
 --- липидных бислоях I: 205-206
 Копропорфириноген II: 249
 Корепрессор III: 118
 Кори болезнь II: 130
 - цикл II: 112
 Корриновое кольцо (ядро) II: 170, 171
 Кортизол II: 223; III: 284
 Кортикостерон II: 223
 Кортикотропин II: 222; III: 296, 297
 Кор-фермент III: 55, 56
 Кость I: 189
 Котранспорт III: 312
 Кофакторы цикла трикарбоновых кислот II: 55
 Кофеин III: 286
 Кофермент А II: 16, 17, 272
 - Q II: 75-76, 81
 «Красное падение» II: 187
 Красные мышцы III: 271
 Крахмал II: 131-132
 Крахмальный гель I: 92
 Креатин III: 270
 Креатинкиназа III: 270
 Креатинфосфат II: 12, 13
 Кребса цикл см. Цикл трикарбоновых кислот
 «Кривые Cot» III: 139
 Кριοэнзимология I: 136
 Кристаллизация I: 50
 Кристмас-фактор I: 173-175
 Кристы II: 72
 Кротонил-АПБ II: 152, 153
 Крысиные яды I: 170; II: 63
 Ксантин II: 273
 Ксантиноксидаза II: 273
 Ксантиолат II: 290
 Ксантобиотические соединения II: 222
 Ксенопус III: 141
 D-Ксилоза II: 46
 D-Ксилулоза II: 47
 Ксилулозо-5-фосфат II: 97-98, 196
 Ксилулозо-6-фосфат II: 117
 Кулона закон I: 122
 Кумулятивная регуляция по типу обратной связи II: 245
 K_i I: 116-117
 K_m см. Константа Михаэлиса
 CoQ см. Кофермент Q

α-Лактальбумин II: 132
 β-Лактамное кольцо III: 224, 225
 Лактат II: 36, 111-112
 Лактат-дегидрогеназа II: 36, 111-112
 Лактоза I; 106; II: 132-133; III: 112-114
 Лактозный аналог тетра-NAG I: 142
 - оператор (лас-оператор) III: 115-117
 - оперон (лас-оперон) III: 114-117
 - репрессор (лас-репрессор) III: 115-117
 Лактозо-синтаза I: 106; II: 132-133
 Лактоназа II: 96
 Ламеллиподии III: 271
 Ланостерол II: 214
 Латеральная диффузия I: 218
 Латиризм I: 190
 Лаурат II: 139
 Леггемоглобин II: 232
 Легкие цепи (L-цепи) III: 238-244
 Лед I: 126
 Лейкемия II: 270
 Лейкины I: 214
 Лейкоциты I: 49
 Лейцин I: 20; II: 173-174; III: 71
 Лейцин-энкефалин III: 296
 Лекарственная идиосинкразия III: 338
 Летальный синтез II: 63
Леша-Нихана синдром II: 276-277
 Лиазы II: 155
 Лигноцерат II: 139
 Лидерная мРНК III: 119-120
 Лизилгидроксилаза I: 181
 Лизилоксидаза I: 190
 Лизин I: 21, 22
 Лизинонорлейцин I: 193
 Лизогенизация III: 120
 Лизогенизирующие фаги III: 202, 204
 Лизогенный цикл III: 122
 Лизосомы I: 166; II: 210-211, 219; III: 163
 Лизофосфатидат II: 205
 Лизоцим I: 132-144; III: 173
 Ликопин II: 226, 227
 D-Ликсоза II: 46
 Лимонен II: 226
 Лимфоциты III: 249-250
 - В и Т III: 235, 256, 257
 Линкер III: 210
 Линолеат II: 139, 156
 Липазы I: 165; II: 140
 Липид А III: 226-227
 Липидные бислои I: 205-208, 218
 Липидный переносчик III: 220-223
 Липиды I: 201, 215
 - мембран I: 200-207; III: 318
 «Липки» концы III: 184
 Липоамид II: 56-59
 Липоевая кислота II: 57
 Липолиз II: 140; III: 297
 Липополисахариды III: 226-229
 Липопотеины II: 218-220, 290
 Липосомы I: 206-207

β-Липотропин III: 296
 Люмиродопсин III: 344
 Лас *см.* Лактоза
 Лас-оператор *см.* Лактозный оператор
 Лас-оперон *см.* Лактозный оперон
 Лас-репрессор *см.* Лактозный репрессор

Магний (ион Mg^{2+}) II: 28, 29
Мак-Ардля болезнь II: 130
 Макрофаги II: 207; III: 271
 Макроэргические соединения *см.* Высокоэнергетическая связь, Высокоэнергетические фосфаты
 Малат II: 52, 53, 155, 198
 Малат-аспартатный шунт II: 85
 Малат-дегидрогеназа II: 53, 155
 Малат-синтетаза II: 159
 4-Малеилацетоацетат II: 175
 Малонат I: 115, II: 67
 Малонил-АПБ II: 151-152
 Малонил-трансацетилаза II: 151, 152
 Малонил-КоА II: 151, 152
 Мальтаза II: 132; III: 229
 Малярия I: 97; II: 104
 D-Манноза II: 46
 Маннозо-6-фосфат III: 163
 Марганец II: 188
 Масла II: 226
 Матрикс II: 71, 72
 Матричные РНК (мРНК) *см.* Информационные РНК
 Мевалонат II: 212-214
 Медиаторы III: 345
 Медь I: 192; II: 191
 Межгенная супрессия III: 96
 Межклеточное соединение III: 305
 - узнавание I: 215
 Межклеточные каналы III: 321, 322
 Меланин II: 177
 Мембранные везикулы II: 201; III: 312
 - липиды I: 201-207
 Мембранный потенциал II: 79-80; III: 304, 313, 327, 332
 - транспорт I: 219; III: 304-325
 Мембраны. *См. также* Клеточные мембраны
 - митохондрий II: 72, 83-84, 86
 - тилакоидов II: 180, 184
 β-Меркаптоэтанол I: 38-39
 β-Меркаптоэтиламин II: 16
 Меромиозин легкий (ЛММ) и тяжелый (ТММ) III: 264, 266, 267
 Метаболизм II: 6-25, 280, 284-286
 - адаптация к голоданию II: 293
 Метаболическая активация II: 222
 - специализация органов II: 283
 Метаморфоз головастика I: 191
 Метанольное отравление I: 118
 Метародопсины III: 344
 Метгемоглобин I: 49, 99
 $N^{15}N^{10}$ -Метенилтетрагидрофолат II: 236, 237
 Метил-акцепторные белки III: 352, 353
 L-Метилвалин III: 63

- Метилглутамат III: 353
 β -Метилглутаконил-КоА II: 174
 7-Метилгуанилат III: 149, 150
 N^5N^{10} -Метилентетрагидрофолат II: 236, 237, 268-269
 Метилирование при хемотаксисе III: 352
 - роль кобаламина II: 172
 Метилированная ДНК III: 177-178
 Метилированный нуклеотид («колпачок», «кеп») III: 60, 149-151
 Метилкобаламин II: 238
 β -Метилкротонил-КоА II: 174
 β -Метилкротонил-КоА-карбоксилаза II: 174
 Метилмалонил II: 169-173
 Метилмалонил-КоА II: 170
 2'-O-Метилрибоза III: 60
 N^5 -Метилтетрагидрофолат II: 236-238
 Металльные группы II: 16, 207, 238-239
 Метионил-тРНК (Мет-тРНК) III: 101
 Метионин I: 21, 154; II: 169-179, 238; III: 75, 76, 100-101
 Метионин-энкефалин III: 295, 296
 Метотрексат II: 270
 Миастения III: 338
 Миелинизированные нервные волокна III: 329, 330
 Миелома III: 240-242
 Микоплазма III: 19
 Микроворсинки III: 275, 276, 313
 Микросомы II: 156
 Микротрубочки III: 276-279
 Микрофиламенты III: 261, 272-274, 276
 Минералокортикоиды II: 222, 224
 Минимальный фермент III: 55
 Миоглобин I: 48-62, 69-72
 - сравнение с гемоглобином I: 63-64, 69
 Миозин III: 261-264, 266-273
 - в немышечных клетках III: 271-273
 Миокиназа II: 10, 264, 293; III: 271. *См. также* Аденлаткиназа
 Миофибриллы III: 260, 262
 Миристин II: 139
 Мирицин II: 226
 Миссенс-супрессоры III: 97
 Митохондриальная АТРаза II: 79
 Митохондрии II: 71-72
 - ДНК в них III: 21, 136-138
 - рибосомы в них III: 153
Михаэлиса константа I: 111-114
Михаэлиса-Ментен уравнение I: 112, 118
 Мицелла I: 205
 Мобильные (подвижные) генетические элементы III: 201-202, 205, 206. *См. также* Вставочные последовательности, Плазмиды
 Модель из шаров и палочек I: 10-11
 Модифицирующая субъединица I: 106; II: 133
 Мозг II: 288
 Молекулярные болезни I: 88-103
 - модели I: 10
 Молекулярный шарнир III: 33, 176, 239, 268, 269
 Молибден II: 231, 276
 Моноаминоксидаза III: 339
 Моноклональные антитела III: 241
 Моноксигеназы II: 175, 222
 Моносахариды II: 24-27
 Морской еж III: 143
 Морфин III: 296
 Мочевая кислота II: 274-276
 Мочевина I: 39; II: 164-166, 273
 мРНК_и III: 153
 Муколипидоз III: 163
 Мутагенез III: 82
 Мутагены химические III: 81, 83
 Мутанты температурочувствительные III: 191-192
 - *pol* III: 27, 28
 - *rif-r* III: 61
 Мутации III: 80-84. *См. также* Делеции, Дупликации, Транслокации
 - и вырожденность кода III: 76
 -- образование антител III: 250, 254-255
 - нонсенс III: 82, 96
 - со сдвигом рамки считывания III: 69, 97
 - супрессия III: 96-97
 - у бактерий III: 353
 Мышечное сокращение III: 260-281
 Мышечные клетки III: 141
 Мышцы I: 18, 19; II: 289; III: 260-261, 304
Мюллера-Рудина способ получения мембран I: 207
 Met-тРНК_и *см.* Метионил-тРНК
 Надмуравьиная кислота I: 32, 38
 Надпочечники II: 225
 Налоксон III: 296
 Наперстянка III: 310-311
 Натриевые каналы III: 327-330, 345-346
 Натрий (ион Na⁺) III: 319-320, 327-328
 - и транспорт сахаров III: 312-313
 - транспорт *см.* Натриевые каналы, Натрий-калиевый насос
 Натрий-калиевый насос III: 305-310, 327
 Негемовое железо II: 52, 75
 Незаменимые аминокислоты II: 230, 233-234, 239
 - жирные кислоты II: 156
 Нейромедиаторы III: 330, 338-340
 Нейротоксины III: 333, 335
 Неконкурентное ингибирование I: 116-117
 Немемилинизированные нервные волокна III: 329
 Ненасыщенные жирные кислоты II: 146
 Неостигмин III: 334, 336
 Непермиссивные клетки-хозяева III: 187
 Неполлярные взаимодействия I: 61-62
 Нервно-мышечное соединение III: 330
 Нервный импульс III: 326-327
 Нециклическое фотофосфорилирование II: 192
 Ниацин II: 17, 270. *См. также* Никотиновая кислота
 Никотинамидадениндинуклеотид (NAD⁺, NADH) II: 14, 36-38, 255, 285
 Никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADP⁺, NADH) II: 15, 16, 95-100, 281

- в биосинтезе холестерина II: 214
- дезоксирибонуклеотидов II: 266-268
- гидроксировании стероидов II: 222
- малат-дегидрогеназной реакции II: 155-156
- образование в цикле трикарбоновых кислот II: 53
- при окислении жирных кислот II: 143-144
- гликолизе II: 32
- фотосинтезе II: 189, 191
- окисление II: 84-85
- стереоспецифичность II: 62
- Никотиновая кислота II: 17, 270-272
- Нингидрин I: 28
- Нитрогеназный комплекс II: 230-232
- 2-Нитро-5-тиоцианат I: 32
- n*-Нитрофенилацетат I: 155, 156
- n*-Нитрофенилдиазоний III: 243
- n*-Нитрофенол I: 155, 156
- Нонактин III: 319, 320
- Норадреналин II: 291, 292; III: 339, 340
- 5'→3'-Нуклеаза III: 25-26, 35
- Нуклеиновые кислоты. *См. также* Дезоксирибонуклеиновая кислота, Рибонуклеиновая кислота
- конформация III: 11-15, 47
- области гомологии III: 55
- Нуклеозиддифосфаткиназа II: 264
- Нуклеозиддифосфаты II: 132
- Нуклеозидмонофосфаткиназы II: 264
- Нуклеозидтрифосфаты II: 256
- Нуклеозид-фосфорилазы II: 273
- Нуклеозиды II: 255-279
- Нуклеосомное «ядро» (минимальная нуклеосома) III: 131-132
- Нуклеосомы III: 129-133, 136-137
- Нуклеотидазы II: 273
- Нуклеотиддифосфаты III: 23
- Нуклеотиды II: 255-279; III: 6, 11-15, 19, 24
- Нуклеофильная атака I: 158
- NAD, NADH *см.* Никотинамидадениндинуклеотид
- NAD-связывающий участок дегидрогеназы II: 37-38
- NADH-дегидрогеназа II: 74
- NADH-Q-редуктаза II: 74-75, 82
- NADP⁺, NADH *см.* Никотинамидадениндинуклеотидфосфат
- NAG *см.* N-Ацетилглюкозамин
- NAM *см.* N-Ацетилмурамовая кислота
- NGF *см.* Фактор роста нервов

- Обратимое ингибирование I: 115
- Обратная связь I: 106; II: 243-245
- транскриптаза III: 178, 190
- транскрипция III: 178-179, 190
- Овальальбумин III: 151-153
- Одноуглеродные фрагменты II: 235-239

- Однопочечная ДНК III: 16, 19, 52, 138, 167, 200
- Оказки фрагменты III: 31
- Окаймленные пузырьки III: 161-162
- β-Окисление II: 143
- Окислительно-восстановительная пара II: 72-73
- Окислительно-восстановительный потенциал II: 73-74, 190
- Окислительное дезаминирование II: 160
- фосфорилирование II: 14, 71, 78, 83, 87-88
- Оксалоацетат II: 49-50, 52-54, 108-109, 168, 198
- Оксалосукцинат II: 61
- Оксианион I: 159, 160
- Оксигемоглобин I: 75-76, 86
- Оксигеназы II: 195, 199, 222
- Оксигенирование I: 56-60
- Оксид азота I: 224
- углерода (CO) I: 60, 61, 86-87; II: 81
- β-Оксоацил-АПБ-редуктаза II: 152
- Оксоацил-CoA II: 143, 144
- α-Оксобутират II: 163, 239, 243
- α-Оксоглутарат I: 181; II: 51, 160, 161, 168-169
- α-Оксоглутаратдегидрогеназный комплекс II: 51, 59
- α-Оксоизокапроат II: 174
- Оксокислоты II: 160, 162, 174, 235
- Октадекадиеновая кислота II: 138
- Олеинат I: 201, 220; II: 139, 156
- Олигоаденилат III: 192
- Олигомицин II: 84
- Олигонуклеотид-синтетаза III: 192
- Олигосахариды III: 159-163
- Онкогенные вирусы III: 186-192
- Ооциты ящериц III: 156, 157
- trp-Оператор III: 118
- Операторный ген III: 114
- λ-Операторы III: 122-124
- trp-Оперон III: 118, 119, 121
- Опероны III: 114-120
- Опий и опиаты III: 295
- Опсины III: 341, 348
- Опухолеродные (онкогенные) вирусы III: 186-192
- Органические фосфаты I: 156; III: 334-337
- Органоспецифичность метаболизма II: 288
- Орнитин II: 164
- Орнитин-карбамоилтрансфераза II: 164
- Оротидилат II: 262, 263
- Ортофосфат II: 12
- Основания как акцепторы протонов I: 45
- Остеомаляция II: 226
- Отжиг ДНК III: 20
- «Отпечатки пальцев» I: 93

- Палиндром III: 38
- Палочки сетчатки II: 281; III: 217, 340-349
- Пальмитат I: 201; II: 139, 145, 156, 159
- Пальмитоил CoA II: 208
- Памахин II: 103
- Панкреатит I: 165
- Панкреатический ингибитор I: 162-164

- Пантотенат (пантотеновая кислота) II: 16, 17, 272-273
- Папаин I: 166; II: 239
- Паповавирусы III: 188
- Паратион III: 335, 336
- Пастера* эффект II: 284
- Пенициллин III: 218, 224-227
- Пенициллиназа III: 225-226
- Пеницилловая кислота III: 225
- Пентаглициновый мостик III: 219
- Пентозофосфатный путь II: 95-114, 284-285
- Пепсин I: 152, 166
- Пепсиноген I: 152, 166
- Пепстатин I: 166
- Пептидазы I: 188-189
- Пептидилтрансфераза III: 104
- Пептидильный участок III: 102
- Пептидная единица I: 33-34
- связь I: 23, 29-30, 32, 104; III: 103-104, 223, 226
- Пептидные карты I: 92-93
- мостики III: 223
- Пептиды I: 27, 30. *См. также* Полипептиды
- Пептозогликаны III: 219, 220, 223-224
- Первичная структура I: 37
- Первичные транскрипты III: 148, 149
- S_n -Переключение III: 253, 256
- Перенос заряда I: 158, 176
- фосфатных групп II: 11-12, 72
- электронов II: 72, 74, 82, 222
- Перехваты *Ранве* III: 329
- Переходное соединение I: 166
- Периплазматическое пространство III: 226
- Пермеаза III: 113, 114, 313
- Пермиссивные клетки-хозяева III: 187
- Пернициозная анемия II: 170, 172
- Пероксисомы II: 199
- D-Петля III: 200, 202
- Печень II: 172, 290-291. *См. также* Клетки печени
- Пикорнавирусы III: 179
- Пили III: 197
- Пиперидин III: 40
- Пираноза II: 26-27
- 2-Пиридинальдоксимметииодид (ПАМ) III: 337
- Пиридоксальфосфат I: 108, 109; II: 161-162
- в фосфорилазе II: 124
- Пиридоксин II: 17, 161
- Пиримидиновые димеры III: 35-37
- Пиримидины II: 255-256; III: 6, 7
- биосинтез II: 262-264, 276
- спаривание с пуринами III: 11-15
- Пирофосфат, гидролиз II: 121, 142, 273; III: 23, 88
- свободная энергия I: 12
- Пирофосфатная связь III: 149, 150
- 5-Пирофосфомевалонат II: 213, 214
- Пиррол I: 48
- Пирролидиновое кольцо I: 55, 183, 185
- Δ -Пирролин-5-карбоксилат II: 169, 235
- Пируват II: 27, 54-58, 106, 108, 286-287
- в C_4 -пути II: 198
- образование и выход энергии II: 32-33, 163, 167-168
- превращение в ацетил-КоА II: 49, 54
- лактат II: 36
- этанол 35-36
- Пируватдегидрогеназный комплекс II: 54-59, 64-65
- Пируват- P_i -дикиназа II: 198
- Пируват-карбоксилаза II: 107, 108
- Пищеварительные ферменты I: 152-178
- Плавнение ДНК III: 19
- коллагена I: 185
- мембран I: 220
- Плазматогены II: 208
- Плазматическая мембрана I: 199; III: 344-345.
- См. также* Клеточные мембраны
- Плазматические клетки III: 235, 256
- Плазмиды III: 201-206
- для пенициллиназы III: 226
- как векторы III: 210-211
- колициногенные III: 210
- ColE1 III: 210, 211
- pBR322 III: 210
- pSC101 III: 205
- Z-Пластинки III: 271
- Пластохинон II: 190-191
- Пластоцианин II: 191
- Пневмококки III: 7-10
- Подагра II: 274-276
- Поджелудочная железа III: 290
- Полиены II: 184, 227; III: 342
- Полилизин III: 71
- Полинуклеотидкиназа III: 64
- Полинуклеотид-фосфорилаза III: 70
- Полинуклеотиды синтетические III: 99
- Полиоксизетилен I: 210
- Полипептид гигантский III: 180, 181
- Полипептидные цепи I: 23-24
- конформация I: 32-34, 38, 40-42
- Полипептиды I: 23-32
- Полипирилметан II: 250
- Полипролин I: 182, 183; III: 71
- Полирибонуклеотиды III: 73
- Полирибосомы III: 100
- Полисахарид III: 7-10
- Полисома III: 100, 101
- Политенные хромосомы III: 147, 148
- Полиуридилат [poly(U)] III: 70
- Полифенилаланин III: 70
- Полицистронный (полигенный) транскрипт III: 115
- Полицистроны III: 149
- Полуальдегид янтарной кислоты III: 340
- Полуацеталь II: 25
- Полукеталь II: 25-26
- Полуконсервативная репликация III: 15-16, 133-134
- Помпе* болезнь II: 130
- Поперечная диффузия I: 218, 224
- Поперечнополосатые мышцы III: 260-262
- Поперечные мостики III: 261, 266
- связи I: 190, 192-193

- Порин III: 229-230, 232
 Порфирины II: 248, 250-251
 Порфирия II: 251
 Порфобилиноген II: 249, 250
 Последовательности ДНК повторяющиеся III: 72-75, 138-140. *См. также* Вставочные последовательности
 - Прибова III: 55
 - сигнальные III: 74-75, 157-159, 231, 252
 - poly(A) III: 149-150
 Постсинаптическая мембрана III: 330, 331
 Потенциал переноса II: 11-12, 16, 72, 74
 - фосфорилирования II: 20
 Потенциалы действия III: 326-328
 Праймаза III: 31, 32
 Превитамин D₃ II: 225-226
 Прегненолон II: 222-223
 Предзатравочный комплекс III: 32
 Прелюмиродопсин III: 344
 Препроинсулин III: 290-292
 Препенат II: 240-241
Прибова последовательности III: 55
 Провитамин D₃ II: 225
 Прогестагены II: 221, 222
 Прогестерон II: 221, 223
 Проинсулин III: 290-292
 - синтез в *E. coli* III: 214
 Прокарбосипептидаза I: 152
 Проколлаген I: 187-189
 Проконвертин I: 175
 Пролилгидроксилаза I: 181
 Пролин I: 20, 21, 55
 Пропилопротеин III: 230, 231
 Промежуточные продукты цикла трикарбоновых кислот II: 64, 65
 Промоторы III: 55-56, 118, 123
 Проницаемость, коэффициент I: 208-209
 - липидных бислоев I: 206-208
 Про-опиокортин III: 296-297
 Пропионил-КоА II: 146-147, 169-170
 Пропионил-КоА-карбоксилаза II: 169
 Проростки пшеницы III: 151
 Простагландин-синтазы III: 298, 299
 Простагландин-циклооксигеназа III: 298
 Простагландины III: 297-298
 Простетические группы I: 48; III: 105
 Протеазы I: 166; III: 174-175
 Протеиназы I: 32, 166
 Протеинкиназы III: 155, 287-288
 Протеогликаны I: 193-194
 Протеолитические ферменты I: 104-105
 Протонный градиент II: 79, 81-82, 91-92, 190-193; III: 313-314
 Протоны, ток (поток) II: 84, 91-92
 Протопласты III: 224-225
 Протопорфирин I: 47; II: 249-250
 Протромбин I: 170-172
 Профаги III: 120-121, 185
 Проферменты (зимогены) I: 105-106, 152-153, 160-161, 165
 Профосфолипаза A₂ I: 165
 Прохиральная молекула II: 62
 Процессинг РНК III: 60-61, 148-152, 252
 Прозластаза I: 152
 Псевдоуридин III: 61
 Псевдохолинэстераза III: 338
 D-Пикоза II: 47
 Пурины II: 255; III: 6, 7, 14
 - биосинтез II: 257-262
 - распад II: 273-274
 - спаривание с пиримидинами III: 11-15
 Пуромидин III: 102, 107
 Пурпурная мембрана II: 200-201
 Пустые килы II: 110
 Пуфы III: 147-148
 Пятиуглеродные единицы III: 226
 рК I: 45, 46, 81-83
 рН I: 45, 143
 PAS-полосы I: 211
 PAS-реакция *см.* Периодат-иод-Шифф
 Рабдовирусы III: 181
 Равновесная седimentация III: 15, 16
 Радиоактивные изотопы II: 61; III: 22
 Радиоиммунологический анализ III: 296
 Разобшители II: 87-88
 Рак, вирусная этиология III: 167, 186-189
 - кожи III: 35-36
 - химиотерапия II: 269
 Рамка считывания, сдвиг III: 69, 82, 83, 97
 Рамноза III: 228
 Растения, C₄-путь II: 198-199
 Рацемазы III: 220
 Рахит II: 225-226
 Реакционный центр II: 185
 Ревертанты III: 83
 Регуляторная субъединица II: 266
 Регуляторный ген III: 113-114
 Редуктаза *см.* Сукцинат-Q-редуктаза, NADH-Q-редуктаза
 Рекомбинация ДНК III: 196-216
 - фага λ III: 185
 Релаксация ДНК III: 20, 21, 33
 Ренатурация антитела III: 240, 241
 - миоглобина I: 62-63
 - РНКазы III: 240
 Рентгеноструктурный анализ I: 50-52
 -- гемоглобина I: 63-64, 76, 83
 -- ДНК III: 11
 -- миоглобина I: 50-58
 Реовирус III: 181-182
 Репарация ДНК III: 35-37
 Репликазы III: 183. *См. также* тРНК-репликаза
 Репликационная вилка III: 28-34, 134-137
 Репликация ДНК III: 14-19, 28-44, 133-136
 -- ошибки III: 24-26
 - РНК III: 180
 - фага T4 III: 174-175
 - ферментативная III: 41-42
 Репрессор III: 113-119, 122-124. *См. также* Лак-

- тозный репрессор, Триптофановый репрессор
- Реснички III: 277-278
- Рестрикция III: 177, 208-209
- фермента III: 38-39, 176-178
- Ретикулоциты III: 98-99, 155
- Ретинали в пурпурной мембране II: 200
- *транс*- и *цис*-изомеры III: 341-344, 348-349
- Ретинол II: 17, 18
- Ретинол-дегидрогеназа III: 343
- Ретровирусы III: 179, 189-190
- Рецепторные ямки II: 219
- Рецепторы антигенов III: 256-257, 293-294
- эстрадиола III: 299-300
- Рибоза II: 255; III: 46
- Рибонуклеаза S I: 17
- Рибонуклеазы I: 39-41, 123, 124; III: 64
- ренатурация III: 240
- Рибонуклеиновая кислота (РНК) III: 46-48, 52-61. *См. также* Гибридизация ДНК-РНК, Двухцепочечная РНК
- положительная (+РНК) и отрицательная (-РНК) III: 179-182
- Рибонуклеозиддифосфаты III: 70
- Рибонуклеозидтрифосфаты III: 52, 73
- Рибонуклеотид 5-аминоимидазола II: 259
- 5-аминоимидазол-4-карбоксамида II: 244, 259
- 5-аминоимидазол-4-карбоксилата II: 259
- 5-аминоимидазол-4-N-сукцинкарбоксиламида II: 259
- никотиновой кислоты II: 270-271
- 5-формилиамоимидазол-4-карбоксамида II: 259
- N'-5'-фосфорибозилформимино-5-аминоимидазол-4-карбоксамида II: 244
- Рибонуклеотид-редуктаза II: 267-268
- Рибонуклеотиды II: 255; III: 34-35
- Рибосомная РНК (рРНК) III: 47-48, 149
- Рибосомы III: 46, 49-50, 72, 97-99, 101-103, 157-158
- митохондрий III: 153
- реконструирование III: 98, 99
- эукариотические (80S) III: 152-153
- Риботимидин III: 61
- Рибофлавин II: 17
- Рибофлавин-5'-фосфат II: 271
- Рибофорины III: 157
- D-Рибулоза I: 47
- Рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза II: 195-197, 203
- Рибулозо-5-фосфат II: 96-100, 196, 197, 257
- Рибулозо-5-фосфат-эпимераза III: 117
- Рибуокиназа III: 117
- Рилизинг-факторы II: 172
- Риновире III: 179
- Рифампицин III: 61-62
- РНК-зависимая ДНК-полимераза (обратная транскриптаза) III: 178, 190
- РНК-полимераза III: 178
- РНК-затравка III: 31-32
- РНК-матрица III: 46, 52
- РНК-полимеразы III: 52-56, 146-147
- РНК-репликаза III: 52, 178, 179
- РНК-синтетаза III: 178
- РНК-содержащие вирусы III: 178-179
- опухолеродные III: 189-190
- РНК-транскрипты III: 148-152
- Родописин III: 340-348
- Ротенон II: 80, 81
- рРНК *см.* Рибосомная РНК
- Сакситоксин III: 328-330
- Самосборка вирусов III: 168-176
- липидных бислоев I: 205
- рибосом III: 98
- Саркозин III: 63
- Сарколема III: 260
- Саркомер III: 261
- Саркомы III: 186
- Саркоплазма III: 260
- Саркоплазматический ретикулум I: 209; III: 271
- и транспорт Ca^{2+} III: 270, 311
- Сателлитная ДНК III: 139, 140
- Сахара II: 24-27, 132
- абсолютная конфигурация II: 25, 46, 47
- номенклатура III: 159
- транспорт III: 312-316
- Сахароза II: 132
- Свертывание крови I: 152, 166-176
- каскад реакций I: 166-167
- Свет, спектр поглощения I: 68. *См. также* Экстинкция
- миоглобина и гемоглобина I: 59
- родопсина III: 342
- хлорофиллов II: 184
- цветовых рецепторов III: 348
- Световые реакции (фотосинтеза) II: 185, 187
- Связь С—С I: 219-220
- Седиментация III: 48
- Седогептулозо-1,7-дифосфат II: 196
- Седогептулозо-7-фосфат II: 97-98
- Секвенатор I: 32
- Селекционная теория III: 240
- Серин I: 21, 22, 156-157, 202; II: 163, 168, 235
- связывание с сахарами I: 214, 216
- Сериндегидратаза II: 163
- Сериновые протеазы I: 157, 163, 165-166
- Серотонин II: 248
- Серповидноклеточная анемия I: 88-90, 94, 97-98
- Сефадекс I: 25
- Сиаловые кислоты II: 209
- Симметрия вирусов III: 168
- во взаимодействии белков с нуклеиновыми кислотами III: 62, 125
- репрессора с оператором III: 115-116
- рестрикции III: 178
- Симпорт III: 312-314
- Синапсы III: 330-331
- электронная микрофотография III: 326
- Синаптическое тельце III: 340
- Синапсомы III: 331
- Синтетазы II: 154; III: 87-90

- Сквален II: 212, 214, 215, 217
 Скваленексид II: 217
 Скелетные мышцы III: 260-262
 β-Складчатый слой I: 34-37
 Скольжение филаментов III: 261-262, 267-269
 Скорость ферментативной реакции максимальной ($V_{\max}$) I: 112-113
 Слепота ночная («куриная») III: 343
 Слизевик III: 272, 273
 Согласованная регуляция по типу обратной связи II: 245
 Соединительная ткань I: 179
 Солевые мостики I: 122
 - (ионные) связи I: 77, 122
 Соматическая рекомбинация III: 250, 252, 254-255
 Соматические гипермутации III: 250
 Соматостатин III: 213-214
 Соматотропин (гормон роста) III: 283
 Сопрягающий фактор (F_1) II: 83-84
 Сопряжение, сопряженные реакции II: 9, 13, 79, 86-88, 92; III: 308-309
 Сопряженная пара кислота-основание I: 45
 D-Сорбоза II: 47
 Спаривание оснований или гомологичных цепей ДНК III: 11-15, 19-20, 196, 198-200
 Спектрин I: 213
 α-Спираль I: 34-36, 55; III: 269. *См. также* Двойная спираль ДНК
 - суперспирализованные I: 30, 36, 178, 183; III: 264
 Спиртовое брожение II: 36
 Сплайсинг III: 26, 61, 79, 81, 150-151, 249-253
 Стеарат I: 220; II: 139
 Стероидные гормоны II: 221-222; III: 298-300
 -- врожденные нарушения II: 224
 Стероиды кардиотонические III: 282, 309-310
 Стоп-кодоны III: 76
 Стрептомицин III: 105-107
 Структурные гены III: 114
 Стюарта фактор I: 175
 Субмитохондриальные частицы II: 83
 Субстрат *см.* Фермент-субстратные комплексы
 Субстратные циклы II: 110-111
 Субтилизин I: 105, 163-164
 Субъединица I: 38
 Сукцинат II: 116; III: 340
 Сукцинат-дегидрогеназа I: 115; II: 32
 Сукцинат-Q-редуктаза II: 75, 82
 Сукцинилхолин III: 337-338
 Сукцинил-CoA II: 31-32, 169, 248-250
 Сукцинил-CoA—синтетаза II: 32
 Сульфаниламид II: 279
 Сульфгидрильный буфер II: 104
 Сульфолипиды II: 184
 Суперспирализация ДНК I: 183; III: 20-21
 Сфингозин I: 203; II: 208, 209
 Сфингомиелин I: 203, 204
 Сшивки *см.* Поперечные связи
 Снэгера реактив I: 29
 Табун III: 335, 336
 D-Тагатоza II: 47
 Талассемия III: 154-155
 D-Талоза II: 46
 Таурин II: 215
 Таурохолат II: 215
 Таутомеры III: 81
 Твин III: 333
 Тейхоевая кислота III: 223-224
 Текучесть мембран I: 219-221
 Темновые реакции (фотосинтеза) II: 185, 193, 195-196
 Температура плавления ($T_{\text{пл}}$) I: 185
 - сжатия (T_s) I: 185
 - тела I: 88
 Температурный переход мембраны I: 219-220
 Теофиллин III: 286
 Терминальная трансфераза III: 209
 Терминация синтеза белка III: 104, 105
 - транскрипции III: 55, 58-60, 74-76, 119, 154
 Термодинамика II: 6
 Термодинамическая стабильность I: 41
 Терпены II: 226
 Тестостерон II: 220, 223, 224; III: 299
 Тетрагидриобиптерин II: 175
 Тетрагидроптерилглутамат *см.* Тетрагидрофолат
 Тетрагидрофолат II: 235-237, 257, 269
 Тетраглициновый мостик III: 221
 Тетрадеканат II: 139
 Тетраидотиронин II: 248
 Тетракозаноат II: 139
 Тетраоксипиримидин III: 295
 Тетрапептид III: 219
 Тетрапиррольное кольцо I: 48
 Тетрациклин III: 107
 Тетраздрическое переходное состояние I: 159, 160
 Тетродотоксин III: 328-330
 Тетрозы II: 25, 46, 47
 Тей-Сакса болезнь II: 210-211
 Тиазолидиновое кольцо III: 224, 226
 Тиамин *см.* Витамин B₁
 Тиаминпирофосфат II: 55-56, 101-102
 Тилакоиды II: 180, 184, 190, 194
 Тимидилатсинтетаза II: 271
 Тимидин (Т) II: 255, 275; III: 6, 13, 14
 - димеры III: 35, 37
 Тимидин-5'-фосфат (TMP) (дезокситимидилат) II: 256, 257
 Тиогаляктозид-трансацилаза III: 112
 Тиоловые протеиназы I: 166
 Тиоредоксин II: 267
 Тиоредоксин-редуктаза II: 268
 Тиозифы II: 40; III: 108
 Тироглобулин III: 160
 Тирозин I: 21, 22, 175, 176; II: 241; III: 152
 - как предшественник нейромедиаторов III: 339
 Тирозингидроксилаза III: 339
 Тирозин-O-сульфат I: 168
 Тироксин II: 248
 Титрование I: 46
 Тканевой фактор I: 174
 Тозил-L-фенилаланинхлорметилкетон I: 157-158

- α-Токоферол II: 18
 Толстые нити III: 261-264, 266-267
 -- реконструкция III: 266
 Топоизомеразы III: 21
 Торр I: 70
 Транзиции III: 80-81
 Трансальдолаза II: 96-98, 102-103
 Трансамидазы I: 169
 Трансамидирование I: 169
 Трансминазы II: 160
 Трансаминирование II: 160-162
 Трансверсии III: 80-81
 Трансгликозилирование I: 144
 Транскарбоксилаза II: 150
 Транскетотлаза II: 96-98, 101-102, 196
транс-Конформация I: 219-220
 Транскрипты *см.* РНК-транскрипты
 Транскрипция III: 46-86, 112
 - выбор цепи III: 53-56, 58-62
 - с РНК III: 180-181
 Транслоказы II: 86; III: 104, 156
 Транслокация в белках III: 156-157
 - в мРНК III: 103-104
 - группы III: 314-316
 - иммуноглобулиновых генов III: 249-250
 Трансляция III: 46. *См. также* Белки, синтез
 - лидерной мРНК III: 119-120
 - направление III: 99-100
 Трансмембранные каналы III: 320-322
 Транспептидаза III: 225
 Транспептидирование III: 223, 225
 Транспозиция (перенос) генов III: 119, 206
 Транспозоны III: 206
 Транспорт *см.* Мембранный транспорт, Симпорт, Транслокация группы
 - пассивный III: 304
 - CO₂ у тропических растений II: 198
 Транспортные антибиотики III: 316-320
 - РНК (тРНК) III: 47-48, 61, 67-68, 90-95, 151-152
 -- мутантные III: 95-97
 -- связывание с рибосомами III: 72
 Трансукцинилаза II: 59
 Трансфераза II: 118
 Трансферрин I: 18
 Трансформация ДНК III: 7-10
 - клеток III: 186-187, 192
 D-Треоза II: 46
 Треонин I: 21, 22; II: 169
 - дезаминирование II: 163
 - превращение в изолейцин I: 106; II: 243
 - связывание с сахарами I: 214, 216
 Треониндегидратаза II: 163
 Треониндеаминаза I: 106; II: 243
 Третичная структура I: 32
 Три-N-ацетилглюкозамин I: 136-137
 Триацилглицерол-синтетазный комплекс II: 205-206
 Триацилглицеролы II: 138-140, 205
 Трикарбоновые кислоты *см.* Цикл трикарбоновых кислот
 1,3,7-Триметилксантин III: 286
 Тринуклеотиды III: 72
 Триозы II: 24, 46, 47
 Триокиназа II: 133
 Триоксипростановая кислота (тригидроксипростаноат) II: 215, 217
 Трипсин I: 30, 105, 152, 161-165
 Трипсиноген I: 165
 Триптофан I: 21, 22; II: 241, 242; III: 71, 72, 75, 118, 121
 Триптофанил-мРНК III: 119
 Триптофановая мРНК (trp-мРНК) III: 118, 121
 Триптофановый оперон III: 53, 59, 118-119, 121
 -- клонирование III: 212
 - репрессор III: 118, 119
 Триптофансинтаза I: 108, 109, 114; II: 241; III: 77, 78
 Тритон X I: 210
 Трифосфатизомераза I: 114; II: 30
 Трифосфопиридиннуклеотид (TNP) *см.* Никотинамидадениндинуклеотидфосфат
 Три-NAG *см.* Три-N-глюкозамин
 тРНК *см.* Транспортные РНК
 тРНК_f *см.* Инициаторная РНК
 тРНК_m III: 100
 Тромбин I: 105, 168-170
 Тромбопластин I: 175
 Тромбоциты I: 166; III: 271
 Тропические растения II: 198-200
 Тропоколлаген I: 179, 182
 Тропомиозин III: 261, 269-270
 Тропонин III: 261, 269-270
 Тропоминовые комплексы III: 269, 270
 Т-трубочки (поперечные трубочки) III: 270, 271
 d-Тубокурарин III: 337, 338
 α-, β-Тубулин III: 276
 Туникамицин III: 161
 Тяжелые (H) цепи III: 238-239, 241-243, 253
 Тяжелый меромиозин III: 264, 266, 267
 Убаин III: 311
 Убихинон II: 75
 Углекислый газ *см.* Диоксид углерода
 Углеродные атомы II: 166-167, 212
 Ультрафиолетовый свет III: 35
 Умеренные фаги III: 120-125
 Уникальные гены III: 144-145
 Уотсона-Крика модель III: 11-14
 Уравнение фотосинтеза II: 180-183, 186
 Урацил II: 255, 257
 - димеры III: 35-36
 Урацил-ДНК-глицозидаза III: 37
 Уреаза II: 275
 Уреотелические организмы II: 164
 Уридилат (уридинмонофосфат, UMP) II: 256, 257, 262-265
 Уридилтрансфераза II: 247
 Уридин (U) II: 255-257
 Уридинтрифосфат (UTP) II: 264, 265
 Уридинфосфат-N-ацетилглюкозамин (UDP-NAG) III: 220-223

Уридинфосфат-N-ацетилмуаровая кислота
(UDP-NAM) III: 220-223

Уриказа II: 275

Урикотелические организмы II: 164

Уроканат II: 168

Уропорфириноген-синтаза II: 251

Уропорфириногены I и III II: 249-251

Усиление сигнала при фоторецепции III: 345

UDP-галактоза II: 134

UDP-галактозо-4-эпимераза II: 134

UDP-глюкоза II: 120-121, 134, 206

UDP-глюкозо-пирофосфорилаза II: 120-121

UDP-глюкуронат II: 252

UMP см. Уридилат (уридинмонофосфат)

УТР см. Уридинтрифосфат

Фаги III: 9

- кольцевая ДНК III: 184

- лизогенные III: 184-185

- трансдуцирующие III: 205

- умеренные III: 184

- F2 III: 182

- G4 III: 78

- Mu III: 202

- P22 III: 229

- T2 III: 9, 10, 19, 48-51

- T4 III: 171-176

- T7 III: 20, 55

- λ III: 18-20, 55, 120-124, 183-185, 202

-- генетическая карта III: 123

- как вектор III: 210-212

- φX174 III: 16-24, 53, 183

Фаговая конверсия III: 229

Факторы инициации III: 102, 155

- освобождения III: 104

- роста нервов (NGF) I: 19; III: 300-301

- свертывания крови I: 167, 175; II: 172; III: 152

- устойчивости III: 205

- F II: 83, 84; III: 201-206

- R III: 202, 205-206

- RTF III: 205

Фаллоидин III: 276

Фарадея число II: 74

Фарнезилпирофосфат II: 214

Фенилаланин I: 21; II: 175, 240, 241; III: 71

- при фенилкетонурии II: 176-178

Фенилаланингидроксилаза II: 175, 177-178

Фенилаланиновая тРНК III: 93

Фенилаланиновый оперон III: 122

Фенилизотиоцианат I: 30

Фенилкетонурия II: 177-178

Фенилпропионат II: 142

Фенилтиогидантоин (ФТГ-аминокислоты) I: 30-32

Фенилуксусная кислота II: 142

Феноксозановое кольцо III: 62, 64

Ферментативный катализ I: 104, 108-109, 136-144, 154-156

-- кинетика I: 114

Фермент-субстратные комплексы I: 102, 108-110, 148, 154-156

Ферменты I: 104-133; II: 283. См. также Активный центр и по названиям

- аденилированные II: 246

- взаимодействие с субстратом I: 108-110, 122-123, 148, 154-156. См. также Фермент-субстратные комплексы

- ковалентный комплекс с АМР II: 263; III: 26

- множественность II: 245

- рестрикции III: 38, 208-209

Ферредоксин II: 188-189, 231

Ферредоксин-NADP⁺-редуктаза II: 189

Ферригемоглобин I: 45

Ферритин I: 18, 214

Феррицианид II: 187

Феррогемоглобин I: 49

Феррохелатаза II: 250

Ферроцианид II: 187

Фертильность см. Фактор F

Фибрин II: 167-169

Фибриновый сгусток I: 167

Фибриноген I: 167-168, 175

Фибринопептиды I: 168

Фибробласты III: 273

Фиброин шелка III: 144

Физостигмин III: 334, 336

Филаменты мышц III: 261-268

Фитоин II: 227

Фитильная боковая цепь II: 226

Флавикадениндинуклеотид (FAD, FADH₂) II: 14-15, 52-53, 73, 84-85, 143, 275

Флавиномононуклеотид (FMN) II: 75, 271

Флагеллин III: 350

Флуорескамин I: 28

Фолиевая кислота II: 270

Формаид I: 10

Формилглицинамидинрибонуклеотид II: 258, 259

Формилметионил-тРНК (fMet-тРНК) III: 76, 87, 100-105

Формилметионин (fMet) III: 76, 100

N¹⁰-формилтетрагидрофолат II: 236

Формил-L-триптофан I: 158, 159

N-Формилиминоглутамат II: 169

N⁵-Формиминотетрафолат II: 236

Фосфагены III: 271

Фосфатаза II: 127

Фосфатидальхолин II: 208

Фосфатидат (фосфотидная кислота) II: 205, 206

Фосфатидилинозитол I: 203

Фосфатидилсерин I: 203; II: 206

Фосфатидилхолин I: 203, 204, 224; II: 207-209

Фосфатидилэтаноламин I: 203; II: 207-208

Фосфатидат I: 202

Фосфатные группы II: 11, 12, 72

Фосфаты высокоэнергетические II: 12

Фосфоангидридные связи II: 10

Фосфоаргинин III: 270, 271

Фосфоацилглицеролы I: 201-203; II: 206-207

3-Фосфогидроксипироват II: 235

Фосфогистидин III: 315

Фосфогликолат II: 199

2-Фосфоглицерат II: 32

- 3-Фосфоглицерат II: 31-32, 194-196, 235
 Фосфоглицераткиназа II: 31-32
 Фосфоглицеромутаза II: 32, 119
 Фосфоглюкомутаза II: 118, 362
 6-Фосфоглюконатдегидрогеназа II: 96, 97
 6-Фосфоглюконо- δ -лактон II: 96
 Фосфодиэстеразы II: 127; III: 285, 346-347
 - змеиного яда III: 64
 Фосфодиэфирная связь III: 6, 7, 23, 26-27
 Фосфоенолпируват I: 32; II: 106-107, 239, 240
 - в C_4 -пути II: 198
 - и активный транспорт III: 314-315
 - при гликолизе II: 32
 -- синтезе UDP-N-ацетилмуравовой кислоты III: 221
 - свободная энергия гидролиза II: 12
 Фосфоенопируват-карбоксикиназа II: 107
 Фосфокреатин III: 270, 271
 Фосфолипаза A_2 I: 165
 Фосфолипазы II: 208, 210
 Фосфолипиды I: 201-203
 - влияние на свертывание крови I: 171-172
 5-Фосфомевалонат II: 214
 4'-Фосфопантетеин II: 272, 273
 4'-Фосфопантотенат II: 272, 273
 4'-Фосфопантотенилцистеин II: 272
 Фосфопентозоизомеразы II: 96-98, 196
 3-Фосфо-5-пирофосфевалонат II: 213, 214
 5'-Фосфорибозил-1-амин II: 258
 N-5'-Фосфорибозилантрилат II: 241, 242
 5-Фосфорибозил-1-пирофосфат (ФРПФ) II: 240, 242, 258, 261
 Фосфорибомутаза II: 273
 Фосфорибулозокиназа II: 196
 Фосфоорилаза II: 123-125, 130
 Фосфорилирование II: 283
 - и активный транспорт III: 307-308, 311, 314-316
 -- регуляция активности ферментов II: 65, 123-127
 - субстратное II: 32
 Фосфорил-ферментные комплексы III: 335
 Фосфорилхолин II: 207-208
 Фосфорильная группа II: 27
 Фосфорная кислота I: 202
 Фосфоролиз II: 116
 Фосфосерин I: 22, 23; II: 235
 Фосфотрансферазная система III: 314-316
 Фосфофруктокиназа II: 30, 33-35, 284
 Фотодыхание II: 199, 200
 Фотореактивирующий фермент III: 35
 Фоторецепторы III: 340-349
 Фотосинтез II: 180-203
 Фотосинтезирующие бактерии II: 186, 200
 Фотосинтетическая единица II: 184-185
 Фотосистемы I и II II: 187-193
 Фототрофы II: 10
 Фотофосфорилирование II: 188, 192, 200-201
 - циклическое II: 191, 193
 Фрагменты иммуноглобулинов (F_{ab} , F_c) III: 237-239
 Фруктоза II: 25-26, 47, 133
 Фруктозо-1,6-бисфосфат II: 28, 30, 106, 107, 196
 Фруктозо-6-фосфат II: 28-29, 106, 195-197
 Фруктозо-1-фосфатный путь II: 133
 α -D-Фруктофураноза II: 26
 Фторацетат II: 63
 Фторацетил-CoA II: 63
 Фтордезоксиридилат II: 269
 5-Фтордезоксиридин III: 189
 Фтординитробензол I: 29
 Фторурацил II: 269
 Фторцитрат II: 63-64
 Фумараза II: 53
 Фумарат (фумаровая кислота) II: 52-53, 165, 169, 175, 176
 4-фумарилацетоацетат II: 175
 Фураноза II: 26
 Фурье разностный метод I: 135
 FAD, FADH₂ см. Флавинадениндинуклеотид
 fMet см. Формилметионин
 fMet-тРНК см. Формилметионил-тРНК
 FMN см. Флавиномононуклеотид
 Хаворта проекционные формулы II: 26
 Хагемана фактор I: 175
 Хеликазы см. Геликазы
 Хемосмотическая гипотеза II: 79
 Хеморецепторы III: 349-350, 352
 Хемотаксис у бактерий III: 349-353
 Хемотрофы II: 10
 Хендерсона-Хассельбальха уравнение I: 45
 Хилла коэффициент I: 72
 - реакция II: 187
 Хиломикроны II: 218
 Химерная ДНК III: 208
 Химическое сопряжение II: 79
 Химотрипсин I: 153-159, 161-164
 Химотрипсиноген I: 152-154, 160
 Хиральность (RS) II: 62, 69
 Хитин I: 133; II: 131
 Хлорамфеникол III: 107
 Хлоропласты II: 180, 181, 184
 - ДНК в них III: 137-139
 - рибосомы в них III: 153
 Хлорофиллы II: 183-184
 Холат натрия I: 210
 Холекальциферол II: 223
 Холерный токсин III: 156, 289
 Холестерол II: 212-227. См. также Гиперхолестеремия
 - в клеточных мембранах II: 204, 221
 Холил-CoA II: 215
 Холин I: 202; II: 207-209; III: 331, 334
 Холлидея модель III: 201
 Хондроитинсульфат I: 193, 195
 Хоризмат II: 239-241
 Хориокарциномы II: 270
 Хроматин III: 128-133
 Хроматография аффинная I: 25
 - гель-фильтрация I: 25
 - ионообменная I: 25

- на бумаге I: 92-93
 Хромосомы (эукариотические) III: 127-165. См. также Политенные хромосомы
 - типа ламповых щеток III: 127
 Хромофор III: 341
 Хрящ I: 194
 Хэча-Слэка путь (C_4 -путь) II: 198

Цветовая слепота III: 348
 Цветовое зрение III: 347-348
 Цвиттерионы I: 19
 Целлюлаза II: 131
 Целлюлоза II: 131
 Центромеры III: 140
 χ -Цепи III: 242, 249, 251
 λ -Цепи III: 242, 251
 Цепь переноса электронов II: 82, 222
 Церамид II: 208-209
 Церебозиды I: 203, 204; II: 208
 Цианид (CN^-) II: 80, 81, 171
 Цианкобаламин II: 171
 Цикл Кальвина II: 196-199
 - мочевины II: 164-166
 - трикарбоновых кислот II: 49-70, 284
 --- связь с циклом мочевины II: 165
 Циклический АМР см. Аденозин-3',5'-монофосфат
 - GMP (сGMP) III: 345-347
 Циклическое фотофосфорилирование II: 191
 Циклогексимид III: 107, 152, 153
 Циклопропановые жирные кислоты I: 223
 Цинга I: 186-187
 Цинк I: 144-146
 Цис-аконитат II: 50, 51
 Цис-вакценат II: 156
 Цис-конфигурация I: 220
 Цистатинин II: 239
 Цистатининаза II: 239
 Цистатинин-синтетаза II: 239
 Цистеин I: 10, 21-24; II: 167, 168, 239; III: 71
 Цистеиновая кислота I: 32
 Цистин I: 24
 Цистидин II: 255-257
 Цитидиндифосфодиацилглицерол (CDP-диацилглицерол) II: 206-207
 Цитидинмонофосфат (цитидилат, CMP) II: 206, 256, 257
 Цитидинтрифосфат (СТР) II: 206-207, 264-266
 Цитозин II: 255, 257; III: 6, 13, 14
 - дезаминирование III: 36, 37
 - спаривание с аденином III: 81, 82
 Цитозинарабинозид III: 189
 Цитохалазин В III: 276
 Цитохром-с-оксидазный комплекс II: 76-78, 80-82
 Цитохром(ы) *a* II: 76-78, 81, 82
 - *b* II: 76-77, 81, 191
 - *c* II: 76-78, 81, 82, 88-91, 191
 - *f* II: 191

- P_{450} II: 222
 Цитохромоксидаза II: 77
 QH_2 -Цитохром *c* II: 82
 QH_2 -Цитохром-*c*-редуктазный комплекс II: 76, 77, 80-82
 Цитрат II: 34-35, 50, 51, 60, 155
 Цитрат-лиаза II: 155
 Цитрат-синтетаза II: 50
 Цитрил-CoA II: 50
 Цитруллин II: 164, 165
 сАМР см. Аденозин-3',5'-монофосфат
 CDP-диацилглицерол см. Цитидиндифосфодиацилглицерол
 СТР см. Цитидинтрифосфат

Четвертичная структура I: 64, 76-77, 81
 Число оборотов (фермента) I: 113-114

Шарнир в молекуле иммуноглобулинов III: 239
 --- миозина III: 268
 Шелковичный червь III: 144
 Шикимат II: 240
 Шиффово основание I: 190, 194; II: 39, 102-103, 161-162; III: 342, 343
 Шавелевая кислота I: 118
 Шавелевоуксусная кислота см. Оксалоацетат
 Шавелевоглюконовая кислота см. Оксалосукцинат
 Щелевые соединения III: 322-324
 Щелочная фосфатаза III: 64
 Щеточная каемка III: 275

Эволюция белков I: 69, 84
 - дивергентная I: 163-164
 - единичный период III: 129
 - иммуноглобулинов III: 248-250, 253
 - конвергентная III: 348
 - молекулярная I: 101
 Эдмана реакция (деградация по Эдману) I: 30-32
 Эзерин III: 334
 Эйкозаноат II: 139
 Эйкозотетраеноат II: 139
 Эйкозотриеноат III: 298
 Экваториальные заместители II: 26, 27
 Экдизон III: 148
 3'→5'-Экзонуклеаза III: 24-26
 Экзонуклеазы III: 64
 Экзоны III: 79, 145
 Экстинкции коэффициент I: 68
 Эластаза I: 152, 161
 Эластин I: 192-193
 Электрический орган III: 332
 - угорь III: 332
 Электрогенный насос III: 307-308
 Электронная микроскопия II: 211, 221-222
 - плотность I: 52-53, 58
 Электроны, перенос и транспорт II: 14-16, 71-78, 81, 85, 87. См. также Цепь переноса электронов
 - смещение I: 144, 148-149
 Электростатические взаимодействия I: 122

- Электрофорез I: 25, 26, 90-91
 - в крахмальном геле I: 92
 -- полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия I: 208-210, 213
 Электрохимический потенциал III: 304
Элерса-Данлоса синдром I: 188
 Элонгация III: 103-104, 106
 - ДНК III: 23, 24
 - жирных кислот II: 149, 151-153, 156
 - РНК III: 52, 53
 - факторы III: 103-104
Эмбдена-Мейергофа путь *см.* Гликолиз
 Эмбриональные гемоглобины I: 75
 - клетки и образование антител III: 250-251, 253
 Эндонуклеаза (эндонуклеазы) III: 63, 64, 192
 - активатор II: 237
 - расщепление чужеродных ДНК III: 176
 - рестрикции III: 176-178, 196
 - УФ-специфичная III: 35
 Эндоплазматический ретикулум II: 282; III: 156-161
 Эндорфины III: 295-296
 Эндоцитоз II: 219
 Энергетические ресурсы организма II: 288-289
 Энергетический заряд II: 20, 35, 65
 Энергия (в биологических процессах) I: 12; III: 32-33
 - активации I: 106-108
 - извлечение II: 16-19
 - метаболические источники II: 288-289
 - перенос II: 185-186
 - преобразование II: 91-92
 - фотосинтеза II: 197
 Энзим (фермент) II: 24
 Энкефалины III: 297
 Энтальпия II: 7
 Энтеропептидаза I: 165
 Энтропия II: 6-7
 Эпидермальный фактор роста III: 300-301
 Эпимеразы в обмене галактозы II: 134
 -- пентозофосфатном пути *см.* Фосфопентозо-изомеразы
 Эпинефрин *см.* Адреналин
 D-Эритроза II: 46
 Эритромицин III: 107, 153
 Эритропоэтическая порфирия II: 250
 Эритрозо-4-фосфат II: 98, 196, 240
 Эритроциты I: 48, 49, 209, 211-214
 - плода I: 75
 - тени III: 307
 D-Эритроулоза II: 47
 Эстрадиол II: 224; III: 299
 Эстрогены II: 222-224
 Эстрон II: 224; III: 299
 Этанол I: 118. *См. также* Спиртовое брожение
 Этаноламин I: 202
 Этидий бромистый III: 39
 Этиленгликоль I: 117-118
 Этиленимин I: 47
 Эукариоты III: 127
 Эфирная связь I: 104, 155, 178
 «Яблочный» фермент II: 155
 Ядерная мембрана III: 127, 188
 Ядовитые грибы III: 146, 276
 Ядро III: 136
 Ядрышко III: 141
 Яды III: 335. *См. также* Грибной яд, Змеиный яд

ОГЛАВЛЕНИЕ

Часть IV. Информация

Глава 24. ДНК: генетическая роль, структура и репликация 6

- 24.1. Ковалентная структура и номенклатура ДНК 6
- 24.2. Трансформация пневмококков с помощью ДНК показала, что гены состоят из ДНК 7
- 24.3. Гены некоторых вирусов состоят из РНК 10
- 24.4. Двойная спираль ДНК Уотсона-Крика 11
- 24.5. Комплементарные цепи служат матрицами друг для друга при репликации ДНК 14
- 24.6. Репликация ДНК полуконсервативна 15
- 24.7. Некоторые вирусы содержат на определенных стадиях жизненного цикла одноцепочечную ДНК 16
- 24.8. Молекулы ДНК очень длинные 18
- 24.9. Двойная спираль может быть обратимо расплавлена 19
- 24.10. Некоторые молекулы ДНК имеют кольцевую форму 20
- 24.11. Кольцевые двухспиральные молекулы ДНК могут находиться в суперспирализованном состоянии 20
- 24.12. Открытие ДНК-полимеразы 21
- 24.13. ДНК-полимераза получает инструкции от матрицы 24
- 24.14. ДНК-полимераза I исправляет ошибки в ДНК 24
- 24.15. ДНК-лигаза соединяет фрагменты ДНК 26
- 24.16. Открытие ДНК-полимераз II и III 27
- 24.17. Расплетание родительской ДНК и синтез новой ДНК происходят в репликационной вилке 28
- 24.18. Репликация ДНК начинается в строго определенном месте и продолжается последо-

вательно в обоих направлениях 29

- 24.19. Одна цепь ДНК синтезируется прерывисто 30
- 24.20. Затравкой синтеза ДНК служит РНК 31
- 24.21. Энергия гидролиза АТФ используется для расплетания родительской ДНК в области репликационной вилки под действием белка гер 32
- 24.22. ДНК-гираза вводит отрицательные супервитки в родительскую ДНК, чтобы облегчить ее расплетание 33
- 24.23. Сложность аппарата репликации, по-видимому, необходима для обеспечения очень высокой надежности 33
- 24.24. Повреждения ДНК постоянно репарируются 35
- 24.25. Рак кожи при золотистой ксеродерме обусловлен нарушением нормальной репарации ДНК 35
- 24.26. ДНК содержит тимин вместо урацила, что делает возможной репарацию дезаминированного цитозина 36
- 24.27. Рестриктурирующие эндонуклеазы совершили переворот в анализе ДНК 37
- 24.28. Последовательность нуклеотидов в ДНК можно быстро определить с помощью специфического химического расщепления 39
- 24.29. Полная последовательность оснований ДНК фага φX174 была определена с помощью метода ферментативной репликации 41
- Заключение 42
- Вопросы и задачи 45

Глава 25. Информационная РНК и транскрипция 46

- 25.1. Структура РНК 46
- 25.2. Клетки содержат три типа РНК: рибосомную, транспортную и информационную 47
- 25.3. Формулирование концепции информационной РНК 48
- 25.4. Экспериментальные данные о существовании информационной РНК-посредника в синтезе белка 49
- 25.5. Опыты по гибридизации показали, что информационная РНК комплементарна кодиру-

ющей ее ДНК-матрице **50**

25.6. Рибосомные РНК и транспортные РНК также синтезируются на ДНК-матрице **51**

25.7. Все клеточные РНК синтезирует РНК-полимераза **52**

25.8. РНК-полимераза получает инструкции от ДНК-матрицы **53**

25.9. Обычно в данном участке генома транскрибируется только одна цепь ДНК **53**

25.10. РНК-полимераза *E. coli* состоит из субъединиц **54**

25.11. Транскрипция инициируется на промоторных участках матричной ДНК **55**

25.12. σ -Субъединица обеспечивает узнавание промоторных участков РНК-полимеразой **55**

25.13. Цепи РНК начинаются с rppG или rppA **56**

25.14. Цепи РНК синтезируются в направлении 5'—>3' **57**

25.15. Матричная ДНК содержит стоп-сигналы для транскрипции **58**

25.16. Белок ρ участвует в терминировании транскрипции **58**

25.17. Многие молекулы РНК после транскрипции расщепляются и химически модифицируются **60**

25.18. Антибиотики-ингибиторы транскрипции: рифамицин и актиномицин **61**

25.19. Разработаны совершенные методы определения последовательности нуклеотидов в РНК **62**

Заключение **63**

Вопросы и задачи **66**

Глава 26. Генетический код и зависимость между генами и белками **67**

26.1. Транспортная РНК - адапторная молекула в синтезе белка **67**

26.2. Аминокислоты кодируются группами из трех оснований, начиная со строго определенной точки **68**

26.3. Расшифровка генетического кода: синтетические РНК могут служить информационными РНК **69**

26.4. Состав кодонов многих аминокислот был определен с помощью сополимеров в качестве матриц **71**

26.5. Тринуклеотиды способствуют связыванию определенных молекул тРНК с рибосомами **72**

26.6. Еще один инструмент расшифровки кода - сополимеры с определенной последовательностью **72**

26.7. Основные свойства генетического кода **75**

26.8. Сигналы инициации и терминации синтеза белка **76**

26.9. Генетический код универсален **76**

26.10. Последовательность оснований гена и последовательность аминокислот соответствующего полипептида коллинеарны **77**

26.11. Некоторые последовательности вирусных ДНК кодируют более одного белка **77**

26.12. Гены эукариот представляют собой мозаику из транслируемых и нетранслируемых последовательностей ДНК **78**

26.13. Мутации возникают в результате изменений последовательности оснований ДНК **80**

26.14. Некоторые химические мутагены весьма специфичны **81**

26.15. Многие мутагенные канцерогены можно выявить по их мутагенному действию на бактерии **82**

Заключение **84**

Вопросы и задачи **85**

Глава 27. Синтез белка **87**

27.1. Аминокислоты активируются и присоединяются к транспортным РНК под действием специфических синтетаз **87**

27.2. Надежность синтеза белка определяется высокой специфичностью аминоацил-тРНК—синтетаз **89**

27.3. Молекулы транспортных РНК имеют общий план строения **90**

27.4. Транспортная РНК имеет L-образную форму **91**

27.5. В узнавании кодона участвует антикодон, а не активированная аминокислота **93**

27.6. Молекула транспортной РНК может узнавать более одного кодона благодаря «качаниям» **94**

27.7. Мутантные молекулы транспортных РНК могут подавлять другие мутации **95**

27.8. Рибосомы - органеллы, в которых происходит синтез белка, - состоят из большой и малой субчастиц **97**

27.9. Рибосомы можно реконструировать из составляющих их молекул белков и РНК **98**

27.10. Белки синтезируются в направлении от аминоконца к карбоксильному концу **98**

27.11. Информационная РНК транслируется в направлении 5'—>3' **99**

27.12. Одну молекулу мРНК одновременно транслирует несколько рибосом **100**

27.13. Синтез белка в бактериях инициируется формилметиониновой тРНК **100**

27.14. Сигналом инициации служит кодон AUG

(или GUG), которому предшествует несколько оснований, способных спариваться с 16S-рнк **101**

27.15. В результате образования иницирующего 70S-комплекса формилметиониновая тРНК связывается с Р-участком **102**

27.16. Фактор элонгации Tu доставляет аминоксил-тРНК в А-участок рибосомы **103**

27.17. После образования пептидной связи происходит транслокация **103**

27.18. Синтез белка терминируется факторами освобождения **104**

27.19. Многие белки модифицируются после трансляции **105**

27.20. Стрептомицин ингибирует инициацию и вызывает неправильное считывание информационной РНК **105**

27.21. Пурамицин вызывает преждевременную терминацию цепи, так как имитирует аминоксил-транспортирующую РНК **107**

27.22. Некоторые короткие пептиды синтезируются без участия рибосом **107**

Заключение **109**

Вопросы и задачи **111**

Глава 28. Регуляция выражения гена в фенотипе **112**

28.1. β -Галактозидаза - индуцибельный фермент **112**

28.2. Открытие регуляторного гена **113**

28.3. Оперон - единица координированной генетической экспрессии **114**

28.4. *lac*-Репрессор - тетрамерный белок **115**

28.5. Последовательность оснований в *lac*-операторе симметрична **115**

28.6. Циклический АМР стимулирует транскрипцию многих индуцибельных катаболических оперонов **116**

28.7. Различные формы одного и того же белка активируют и ингибируют транскрипцию арабинозного оперона **117**

28.8. Транскрипция триптофанового оперона регулируется и аттенуатором, и оператором **118**

28.9. Аттенуация опосредуется трансляцией лидерной мРНК **119**

28.10. Аттенуаторный участок гистидинового оперона содержит семь гистидиновых кодонов подряд **120**

28.11. Репрессоры и активаторы детерминируют развитие умеренных фагов **120**

28.12. Два оператора фага лямбда содержат ряд участков связывания репрессора **122**

28.13. λ -Репрессор регулирует собственный синтез **123**

Заключение **125**

Вопросы и задачи **126**

Глава 29. Эукариотические хромосомы и выражение генов у эукариот **127**

29.1. Эукариотическая хромосома содержит одну молекулу двухспиральной ДНК **128**

29.2. Эукариотическая ДНК прочно связана с основными белками - гистонами **128**

29.3. Последовательности аминокислот в гистонах H3 и H4 почти одинаковы у всех животных и растений **129**

29.4. Нуклеосомы - повторяющиеся субъединицы хроматина **129**

29.5. Минимальная нуклеосома («ядро» нуклеосомы) состоит из ДНК длиной 140 пар оснований, намотанной на октамер гистонов **131**

29.6. Нуклеосома - первый уровень конденсации ДНК **133**

29.7. Репликация эукариотической ДНК начинается во многих местах и идет в двух направлениях **133**

29.8. Новые гистоны образуют новые нуклеосомы на отстающей дочерней нити ДНК **136**

29.9. Митохондрии и хлоропласты содержат собственную ДНК **137**

29.10. Эукариотическая ДНК содержит много повторяющихся последовательностей оснований **138**

29.11. Высокоповторяющаяся ДНК (сателлитная ДНК) локализована в центромерах **140**

29.12. Гены, кодирующие рибосомные РНК, расположены один за другим tandemно и повторяются несколько сот раз **140**

29.13. Гены гистонов собраны вместе и повторяются tandemно много раз **143**

29.14. Многие белки, синтезирующиеся в больших количествах, кодируются уникальными генами **144**

29.15. Большинство уникальных генов перемежается повторяющимися последовательностями **145**

29.16. Почти все гены высших эукариот, кодирующие белки, имеют разорванное строение **145**

29.17. РНК в эукариотических клетках синтезируется тремя различными РНК-полимеразами **146**

29.18. Грибной яд α -аманитин - мощный ингибитор РНК-полимеразы II **146**

29.19. Специфические гены могут активироваться для транскрипции **147**

29.20. Три вида рибосомных РНК образуются

в результате процессинга одного первичного транскрипта **148**

29.21. Информационные РНК избирательно образуются из больших ядерных предшественников РНК (гетерогенной ядерной РНК, гяРНК) **148**

29.22. На 5'-конце мРНК находятся «колпачки», а на 3'-конце, как правило, poly(A)-последовательности **149**

29.23. Ферменты сплайсинга с высокой точностью удаляют интроны из первичных транскриптов разорванных генов **150**

29.24. В настоящее время известны последовательности оснований многих информационных РНК **151**

29.25. Эукариотическая рибосома (80S) состоит из малой (40S) и большой (60S) субчастиц **152**

29.26. Талассемия - генетически обусловленное нарушение синтеза гемоглобина **154**

29.27. Трансляция регулируется каскадом протеинкиназ, инактивирующим один из факторов инициации **155**

29.28. Дифтерийный токсин блокирует синтез белка у эукариот, ингибируя транслокацию **155**

29.29. Рибосомы, связанные с эндоплазматическим ретикуломом, синтезируют секреторные и мембранные белки **156**

29.30. Сигнальные последовательности позволяют секреторным белкам проходить через мембрану эндоплазматического ретикула **157**

29.31. Присоединение сахарных остатков «ядра» к гликопротеинам происходит в эндоплазматическом ретикулуме при участии донора долихола **159**

29.32. Модификация и сортировка гликопротеинов происходит в аппарате Гольджи **161**

Заключение **163**

Глава 30. Вирусы **167**

30.1. Оболочка мелких вирусов состоит из множества идентичных белковых субъединиц **167**

30.2. Самосборка вируса табачной мозаики (взм) **168**

30.3. При сборке вирусной частицы ВТМ белковые диски присоединяются к петле РНК **169**

30.4. Заражение фагом Т4 полностью перестраивает синтез макромолекул в клетке **171**

30.5. В упорядоченной сборке фага Т4 участвуют вспомогательные белки и протеазы **173**

30.6. В репликации фага Т4 участвует конкатемерный промежуточный продукт **174**

30.7. ДНК фага Т4 вводится в предобразованную головку **175**

30.8. Гибкость белка оболочки ВККТ позволяет

ему образовывать икосаэдрический капсид **176**

30.9. Бактериальные рестрикционные эндонуклеазы расщепляют чужеродные молекулы ДНК **176**

30.10. Стратегия репликации РНК-содержащих вирусов **178**

30.11. Белки вируса полиомиелита образуются путем множественного расщепления гигантского предшественника **179**

30.12. С геномной РНК вируса везикулярного стоматита транскрибируется пять моноцистронных мРНК **180**

30.13. Геном реовируса состоит из десяти различных молекул двухцепочечной РНК **181**

30.14. Мелкие РНК-содержащие фаги содержат перекрывающиеся гены **182**

30.15. Дарвиновская эволюция фаговой РНК вне клетки **183**

30.16. Лизогенные фаги могут включать свою ДНК в состав ДНК клетки-хозяина **184**

30.17. Ретровирусы и некоторые ДНК-содержащие вирусы могут вызывать рак у чувствительных клеток-хозяев **186**

30.18. Вирусы SV-40 и полиомы могут вызывать продуктивную инфекцию или трансформацию клеток-хозяев **187**

30.19. Ретровирусы содержат обратную транскриптазу, которая синтезирует двухспиральную ДНК, используя в качестве матрицы (+)РНК **189**

30.20. Ретровирусная ДНК транскрибируется только в том случае, если она интегрирована с геном клетки-хозяина **190**

30.21. Киназа, кодируемая геном *src* вируса саркомы птиц, участвует в трансформации **191**

30.22. Двухцепочечная РНК подавляет синтез белка в клетках, обработанных интерфероном **192**

Заключение **193**

Глава 31. Перестройки генов: рекомбинация, транспозиция и клонирование **196**

31.1. В основе генетической рекомбинации лежат разрыв и воссоединение цепей ДНК **196**

31.2. При генетической рекомбинации происходит спаривание гомологичных цепей ДНК с образованием двухцепочечного промежуточного продукта **198**

31.3. Белок *гесА* катализирует АТР-зависимый обмен цепей ДНК при генетической рекомбинации **200**

31.4. Бактерии содержат плазмиды и другие

подвижные генетические элементы	200
31.5. Фактор F позволяет бактериям передавать гены реципиентам путем конъюгации	201
31.6. Плазмиды факторы R придают бактериям устойчивость к антибиотикам	205
31.7. IS-элементы могут присоединяться к неродственным генам	206
31.8. В лаборатории можно сконструировать новые геномы и клонировать их в клетках-хозяевах	207
31.9. Ферменты рестрикции и ДНК-лигаза - необходимые инструменты для получения рекомбинантных молекул ДНК	208
31.10. Плазмиды и фаг лямбда - наиболее подходящие векторы для клонирования ДНК в бактериях	210
31.11. Из суммарной геномной ДНК, расщепленной рестриктирующими эндонуклеазами, можно выделить с помощью клонирования определенные эукариотические гены	211
31.12. Эукариотические гены могут транскрибироваться в бактериальных клетках	212
31.13. Химически синтезированный ген пептидного гормона соматостатина экспрессируется в клетках <i>E. coli</i>	213
31.14. Перспективы клонирования генов	214
Заключение	215

Часть V. Молекулярная физиология

Глава 32. Оболочки бактериальных клеток 218

32.1. Клеточная стенка - это огромная мешковидная макромолекула	219
32.2. Стадии синтеза пептидогликана	220
32.3. Синтез UDP-углевод-пептидного звена	220
32.4. Перенос углевод-пептидного звена на липидный переносчик	220
32.5. Синтез дисахарид-пептидного звена, прикрепленного к липидному переносчику	221
32.6. Перенос дисахарид-пептидного звена на растущую полисахаридную цепь	222
32.7. Поперечные мостики между полисахаридными цепями образуются в реакции транспептирования	223
32.8. У грам-положительных бактерий пептидогликан покрыт тейхоевой кислотой	223
32.9. Пенициллин вызывает гибель растущих бактерий, ингибируя синтез клеточных стенок	224
32.10. Пенициллин блокирует синтез клеточных	

стенок путем ингибирования реакции транспептирования	225
32.11. Некоторые бактерии резистентны к пенициллину, так как синтезируют разрушающий его фермент	225
32.12. Грам-отрицательные бактерии окружены наружной мембраной, богатой липополисахаридами	226
32.13. Благодаря разнообразию О-боковых цепей грам-отрицательные бактерии противостоят защитным силам организма-хозяина	228
32.14. Порин образует в наружной мембране каналы для небольших полярных молекул	229
32.15. Новообразованные белки наружной мембраны содержат отщепляемую сигнальную последовательность	230
Заключение	231

Глава 33. Иммуноглобулины 234

33.1. Основные определения	234
33.2. Синтез специфических антител в ответ на антиген	235
33.3. Участки антител, связывающие антиген, подобны активным центрам ферментов	236
33.4. Препараты антител с определенной специфичностью обычно гетерогенны	237
33.5. При ферментативном расщеплении иммуноглобулина G образуются активные фрагменты	237
33.6. Иммуноглобулин G состоит из L- и H-цепей	238
33.7. Иммуноглобулин G - гибкая Y-образная молекула	239
33.8. Антитела под действием отбора или инструкции образуются	240
33.9. Конец инструктивной теории	240
33.10. Иммуноглобулины миеломы и гибридомы гомогенны	240
33.11. Каждая L- и H-цепь состоит из вариабельного и константного участков	241
33.12. Участок связывания антигена образован гипервариабельными фрагментами L- и H-цепей	243
33.13. Вариабельная и константная области выполняют разные функции	243
33.14. Молекулы антител уложены с образованием компактных доменов, имеющих гомологичные последовательности	244
33.15. Рентгеноструктурный анализ связывающих участков антител показал, как происходит связывание некоторых гаптогенов	245
33.16. Разные классы иммуноглобулинов различаются по биологической активности	246
33.17. Молекулы антител возникли в результате дупликации и последующей дивергенции генов	248
33.18. Вариабельные и константные области ко-	

дируются разными, но соединившимися генами **249**

33.19. Как возникает разнообразие специфичности антител? **250**

33.20. Вариабельные участки L- и H-цепей кодируются несколькими сотнями генов **250**

33.21. Открытие генов *J* (соединяющих) - дополнительного источника разнообразия антител **251**

33.22. Соединение генов *V* и *J* в различных рамках также способствует разнообразию антител **252**

33.23. мРНК для L- и H-цепей образуются путем сращивания (сплайсинга) первичных продуктов транскрипции **252**

33.24. Разные классы антител образуются в результате перескока генов V_H **253**

33.25. Разнообразие антител обусловлено соматической рекомбинацией многих генов клеток зародышевого пути и соматической мутацией **254**

33.26. Клонально-селекционная теория образования антител **255**

33.27. На поверхности клеток, продуцирующих антитела, имеются рецепторы антигенов **256**

33.28. Биологическое значение клональной селекции **257**

Заключение **257**

Глава 34. Мышечное сокращение и подвижность клеток **260**

34.1. Мышца состоит из взаимодействующих друг с другом толстых и тонких белковых нитей **260**

34.2. При мышечном сокращении происходит скольжение толстых и тонких нитей относительно друг друга **261**

34.3. Миозин образует толстые нити; он гидролизует АТФ и связывает актин **262**

34.4. Миозин можно расщепить на активные фрагменты **264**

34.5. Актин образует нити, которые соединяются с миозином **265**

34.6. Актин повышает АТФ-азную активность миозина **265**

34.7. Толстые и тонкие нити мышечного волокна определенным образом ориентированы **266**

34.8. Полярность толстых и тонких нитей в середине саркомера меняется на противоположную **267**

34.9. «Рабочим ходом» является поворот связанной с актином S1-головки миозина **267**

34.10. Тропонин и тропомиозин опосредуют регуляторное действие ионов кальция на мышечное сокращение **269**

34.11. Поток ионов Ca^{2+} регулируется саркоплазматическим ретикулумом **270**

34.12. Фосфокреатин - форма запасаения $\sim\text{P}$ **270**

34.13. Актин и миозин служат сократительными элементами почти во всех эукариотических клетках **271**

34.14. Распределение микрофиламентов в клетке выявляется методом иммунофлуоресцентной микроскопии **272**

34.15. Прикрепленные к мембране нити актина опосредуют сокращение микроворсинок кишечника **274**

34.16. Цитохалазин и фаллоидин тормозят подвижность, сопряженную с процессами сборки и дезагрегации нитей актина **276**

34.17. Микротрубочки участвуют в различных видах клеточной подвижности и частично формируют цитоскелет **276**

34.18. Биение ресничек и движение жгутиков обусловлено скольжением микротрубочек, индуцированным динеином **277**

Заключение **279**

Глава 35. Действие гормонов **282**

35.1. Открытие циклического АМР - посредника в действии многих гормонов **282**

35.2. Циклический АМР синтезируется аденилатциклазой и расщепляется фосфодиэстеразой **285**

35.3. сАМР служит вторым посредником при действии многих гормонов **285**

35.4. Сопряжение рецепторов гормонов с аденилатциклазой осуществляется белком, связывающим гуаниннуклеотиды **286**

35.5. Циклический АМР активирует протеинкиназы **287**

35.6. Циклический АМР - эволюционно древний сигнал голодания **288**

35.7. Холерный токсин стимулирует аденилаткиназу, ингибируя GTPазную активность G-белка **289**

35.8. Инсулин стимулирует анаболические процессы и ингибирует катаболические процессы **290**

35.9. Препроинсулин и проинсулин - предшественники активного гормона **290**

35.10. Трехмерная структура инсулина **292**

35.11. Рецепторы инсулина локализованы в плазматической мембране клеток-мишеней **293**

35.12. Недостаточность инсулина вызывает диабет **294**

35.13. Эндорфины - пептиды мозга, действующие

подобно опиатам **295**

35.14. При расщеплении проопиокортина образуется несколько пептидных гормонов **296**

35.15. Простагландины - модуляторы действия гормонов **297**

35.16. Простагландины образуются из ненасыщенных жирных кислот **298**

35.17. Стероидные гормоны активируют специфические гены **298**

35.18. Белковые факторы роста типа ФРН и ЭФР стимулируют пролиферацию клеток-мишеней **300**

Закключение **301**

Глава 36. Мембранный транспорт 304

36.1. Различие между пассивным и активным транспортом **304**

36.2. Открытие системы активного транспорта ионов натрия и калия **305**

36.3. И фермент, и насос ориентированы в мембране **307**

36.4. АТФ преходяще фосфорилирует натрий-калиевый насос **307**

36.5. Транспорт ионов и гидролиз АТФ тесно сопряжены **308**

36.6. Натрий-калиевый насос - олигомерный трансмембранный белок **308**

36.7. Модель механизма действия натрий-калиевого насоса **309**

36.8. Кардиотонические стероиды - специфические ингибиторы $(Na^+ + K^+)$ -АТФазы и $(Na^+ + K^+)$ -насоса **309**

36.9. Транспорт кальция осуществляется другой АТФазой **311**

36.10. Поток Na^+ обеспечивает энергией активный транспорт сахаров и аминокислот в животных клетках **312**

36.11. Поток протонов служит движущей силой во многих процессах транспорта у бактерий **313**

36.12. Активный транспорт ряда сахаров сопряжен с их фосфорилированием **314**

36.13. Транспортные антибиотики повышают ионную проницаемость мембран **316**

36.14. Транспортные антибиотики функционируют либо как подвижные переносчики, либо как каналообразователи **317**

36.15. Антибиотики-переносчики имеют форму скорлупы ореха и связывают ионы в своей центральной полости **318**

36.16. Валиномицин связывает K^+ в 1000 раз

прочнее, чем Na^+ **319**

36.17. Можно выявить поток ионов через единственный канал в мембране **320**

36.18. Через щелевые соединения ионы и небольшие молекулы перетекают из клетки в клетку **322**

Закключение **324**

Глава 37. Возбудимые мембраны и сенсорные системы 326

37.1. Потенциалы действия опосредованы кратковременными изменениями проницаемости для Na^+ и K^+ **326**

37.2. Тетродотоксин и сакситоксин блокируют натриевые каналы в мембранах аксонов нервных клеток **328**

37.3. Ацетилхолин является нейромедиатором **330**

37.4. Ацетилхолин открывает в постсинаптической мембране каналы для катионов **331**

37.5. Ацетилхолин высвобождается квантами **331**

37.6. При добавлении ацетилхолина реконструированные мембранные пузырьки становятся проницаемыми для катионов **332**

37.7. Ацетилхолин быстро гидролизруется, и концевая пластинка реполяризуется **334**

37.8. Ингибиторы ацетилхолинэстеразы используются как лекарственные средства и как яды **334**

37.9. Разработка антидота для лечения отравлений органическими фосфатами **336**

37.10. Ингибиторы ацетилхолинового рецептора **337**

37.11. К числу нейромедиаторов относятся также катехоламины и γ -аминомасляная кислота (ГАМК) **338**

37.12. Для возбуждения палочки сетчатки глаза достаточно одного фотона **340**

37.13. Родопсин - фоторецепторный белок палочек **340**

37.14. Свет вызывает изомеризацию 11-*цис*-ретиная **343**

37.15. Свет вызывает гиперполяризацию плазматической мембраны наружного сегмента палочек **344**

37.16. Медиаторы передают сигнал от фотолизированного родопсина на плазматическую мембрану **345**

37.17. Свет снижает содержание циклического GMP путем активации фосфодигстеразы **346**

37.18. Цветовое зрение опосредуется фоторецепторами трех типов **347**

37.19. 11-*цис*-ретиная - хромофор всех известных органов зрения **348**

37.20. Хеморецепторы бактерий воспринимают специфические молекулы и передают сигналы

на жгутики **349**

37.21. В основании бактериального жгутика находится вращающий его реверсивный «мотор» **350**

37.22. Бактерии различают временной градиент, а не одномоментный пространственный градиент концентраций **351**

37.23. При бактериальном хемотаксисе передача информации обеспечивается метилированными белками **352**

Заключение **353**

Ответы на вопросы и задачи **356**

Приложения 358

Приложение А. Физические константы и перевод единиц из одной системы в другую **358**

Приложение Б. Порядковые номера и атомные массы элементов **359**

Приложение В. Значение pK' для ряда кислот **360**

Приложение Г. Стандартные длины связей **360**

Приложение Д. Стандартные сокращения, принятые в биохимии **361**

Предметный указатель **362**

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:

129820, Москва, И-110, ГСП

1-й Рижский пер., д. 2,

издательство «Мир».

Люберт Страйер

БИОХИМИЯ, ТОМ 3

Ст. научн. редактор Л. Г. Тер-Саркисян

Мл. научн. редактор О. А. Горгун

Художник И. Б. Кравцов

Художественный редактор Л. М. Кузнецова

Технический редактор З. И. Резник

Корректор М. А. Смирнов

ИБ № 3853

Сдано в набор 24.01.84.

Подписано к печати 6.08.85.

Формат 70 x 100/16.

Бумага офсетная № 1.

Гарнитура тайме. Печать офсетная.

Объем 12,5 бум.л. Усл.печ.л. 32,5.

Усл.кр.-отг. 130,54. УЧ.-ИЗД.Л. 37,22.

Изд. № 4/2707. Тираж 17100 экз. Зак. 97.

Цена 3 р. 70 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Можайский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли.

143200, г. Можайск, ул. Мира, 93.

Замеченные опечатки

Страница	Колонка	Строка	Напечатано	Следует читать
Том I				
76 (подпись к рис. 4.11)		5 сн.	$\alpha_2\beta_1$ -контактов	$\alpha_1\beta_2$ -контактов
173	Левая	3 сн.	Халдейн	Холдейн
196	(подпись к рис. 9.27)	1-3 сн.	North-Holland, 1975, р. 105. Заказ 667. стр. 33-38 Голдобина С.	North-Holland, 1975, р. 105
Том II				
72	Левая	13 сн.	Съёстранд	Шестранд
88	Правая	17 сн.	Дикерсон	Диккерсон
96	Левая	8-я св.	Дикенс	Диккенс
200	»	8 сн.	Стекениус	Стеkkениус
201	»	17 св.	»	»
273	Правая	5 сн.	Аллантoевую	Аллантoиновую

Шлегель Г. ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Пер. 6-го нем. изд.- М.: Мир, 1987-38л., ил.- В пер.: 3 р.

Книга представляет собой перевод шестого издания популярного в ФРГ учебника микробиологии, в котором четко, ясно и компактно изложены современные сведения об организации и жизнедеятельности микроорганизмов. Шестое издание значительно переработано и дополнено по сравнению со вторым, выпущенным в 1972 году издательством «Мир».

Для микробиологов - научных сотрудников и работников микробиологической промышленности, преподавателей и студентов биологических факультетов.